

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 9월 3일 (03.09.2020)

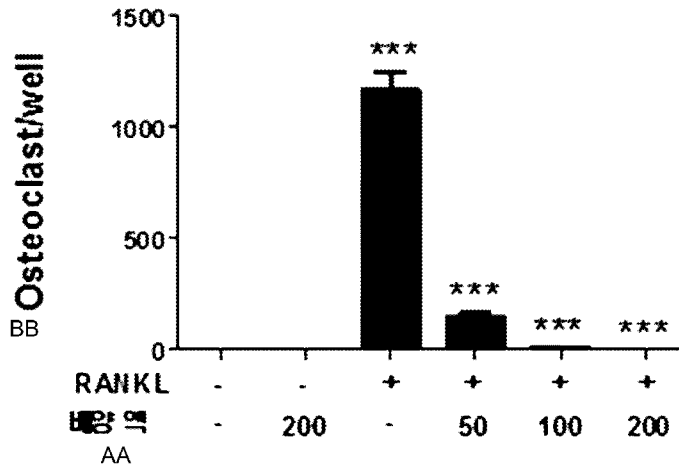


(10) 국제공개번호
WO 2020/175869 A2

- (51) 국제특허분류: A61K 35/747 (2015.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/002612
- (22) 국제출원일: 2020년 2월 24일 (24.02.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0022670 2019년 2월 26일 (26.02.2019) KR
10-2019-0022671 2019년 2월 26일 (26.02.2019) KR
10-2020-0012763 2020년 2월 3일 (03.02.2020) KR
- (71) 출원인: 전남대학교산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 61186 광주시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 박종환 (PARK, Jong Hwan); 61746 광주시 남구 노대실로 49 610-102, Gwangju (KR). 최주희 (CHOI, Joo Hee); 57936 전라남도 순천시 삼산로 81 103-303, Jeollanam-do (KR). 정도현 (JUNG, Do Hyeon); 61684 광주시 남구 봉선로133번길 4 2-501, Gwangju (KR).
- (74) 대리인: 윤대웅 (YOON, Dae Woong); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922 603호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: COMPOSITION FOR IMPROVING, PREVENTING, OR TREATING BONE DISEASES OR METABOLIC DISEASES, INCLUDING NOVEL LACTOBACILLUS SAKEI CVL-001 STRAIN AND CULTURE MEDIUM THEREOF

(54) 발명의 명칭: 신규한 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 골 질환 또는 대사성 질환 개선, 예방 또는 치료용 조성물



AA ... Culture medium
BB ... Osteoclast/wel

(57) Abstract: The present invention relates to a novel Lactobacillus sakei CVL-001 strain and a method for isolating same, wherein the strain is lactic acid bacteria which can be isolated from kimchi, and thus can be effectively used as a probiotic or food additive. Furthermore, the present invention relates to a composition for improving, preventing, or treating bone diseases or metabolic diseases, including Lactobacillus sakei CVL-001 strain (*Lactobacillus sakei*) or a culture medium thereof, wherein the Lactobacillus sakei strain isolated from kimchi and the culture medium thereof exhibit the effects of suppressing osteoclast differentiation, improving osteoporosis, suppressing adipocyte differentiation, and suppressing weight gain, and thus can be effectively used for the improvement, preven-



WO 2020/175869 A2

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별
도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된
생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i)
및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

tion, or treatment of osteoporosis or obesity related diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 및 이의 분리 방법에 관한 것으로서, 상기 균주는 김치로부터 분리할 수 있는 유산균이므로, 이를 효과적으로 생균제 또는 식품 첨가제로서 이용할 수 있다. 또한, 본 발명은 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주(*Lactobacillus sakei*) 또는 이의 배양액을 포함하는 골 질환 또는 대사성 질환 개선, 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 김치로부터 분리한 락토바실러스 사케이 균주와 그의 배양액이 과골세포 분화 억제, 골다공증 질환 개선, 지방세포 분화 억제 및 체중 증가 억제 효과를 나타내므로, 이를 효과적으로 골다공증 또는 비만 질환의 개선, 예방 또는 치료에 이용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 신규한 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 골 질환 또는 대사성 질환 개선, 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 과학기술정보통신부의 지원 하에서 과제번호 2018R1A2B3004143에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국연구재단, 연구사업명은 "중견연구자지원사업", 연구과제명은 "병원체 감염에 대한 Nod2 매개 세포/조직 특이적 방어시스템 연구", 주관기관은 전남대학교 산학협력단, 연구기간은 2018.03.01 ~ 2022.02.28이다.
- [2] 본 특허출원은 2019년 2월 26일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2019-0022670호 및 제10-2019-0022671호, 및 2020년 2월 3일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2020-0012763호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [3] 본 발명은 신규한 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CVL-001 균주 및 이의 분리 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 김치로부터 분리하여 동정한 신규한 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주에 관한 것이다.
- [4] 또한 본 발명은 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 골 질환 또는 대사성 질환 개선, 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 신규한 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물의 골 질환 또는 대사성 질환 개선, 예방 또는 치료 효과에 관한 것이다.

배경기술

- [5] 김치와 같은 전통 발효식품에 풍부하게 존재하는 유산균은 인체의 소화계에 공생하면서 섬유질 및 복합 단백질을 분해하여 중요한 영양성분으로 만드는 역할을 담당하며, 장내 pH를 산성으로 유지시켜 대장균이나 크로스트리디움(*Chlostridium* sp.)과 같은 유해균의 번식을 억제하고 설사와 변비를 개선할 뿐만 아니라, 비타민 합성, 혈중 콜레스테롤 저하 등의 역할을 한다. 특히 유산균은 장의 점막과 상피세포에 강하게 결합할 수 있는 특성이 있어 정장작용에 많은 도움을 준다.
- [6] 또한, 유산균은 대식세포(macrophage)의 증식을 촉진하여 대식세포의 장내 유해 세균에 대한 인지능력, 살균능력을 강화시키고, 면역 관련 물질의 분비를 촉진하여 면역 증강효과를 나타내는 것으로 알려져 있다 (Gabriela peridgon et al. J of food Protection 53: 404-411, 1990; Katsumasa sato et al., Microbiol Immunol., 32(7): 689-698, 1998).

- [7] 락토바실러스 속 미생물은 동형 또는 이형발효를 하는 유산균으로서, 유제품이나 채소의 발효과정에서 흔히 볼 수 있는 균이다. 최근 락토바실러스 속 미생물을 생균제, 식품 첨가제 등으로 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [8] 최근에, 건강 및 질병 모두를 위해 장내 미생물(gut microbiota; 이하 GM)의 중요성이 집중적으로 연구되어 왔다. GM은 총괄적으로 인간 게놈 보다 150배 더 많은 유전자를 함유하는 엄청난 양의 박테리아로 구성된다. 이는 출생시 얻어지며, 구별되는 실체(distinct entity)임에도 불구하고, 분명히 인간 게놈과 함께 공진화하고, 다양한 방식으로 이의 숙주와 소통하고 영향을 미치는 다세포 생물로 간주될 수 있다.
- [9] GM의 구성은 음식 및 항생체 치료와 같은 다수의 환경적 요인에 의해 조절된다. 장내 미생물에 의해 생산된 분자들은 유익할 수도 있고 해로울 수도 있으며, 장 내의 내분비 세포, 장 신경계, 장 투과성 및 면역 시스템에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 동요된 미생물 구성은 크론병, 궤양성 대장염, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 당뇨, 음식 알레르기, 습진 및 천식뿐만 아니라 비만 및 대사 증후군을 포함하여 장 내외에서 다양한 염증 조건에 연루되는 것으로 상정되어 왔다.
- [10] 갱년기의 여성에게서는 여러 폐경 증후들이 나타나는데, 특히 에스트로겐의 감소로 인해 뼈에서 칼슘이 빠져나가 뼈의 질량이 감소하고 구멍이 많아지므로 골 손실의 증가 등으로 골다공증 질환의 발병률이 높아지게 되었다. 폐경기 이후 후기변화는 증상이 나타나기까지 다소 시간이 걸릴 수 있으므로 문제를 쉽게 자각하지 못하는 경우가 많다. 보건복지부 국민 건강 통계치에서 30세 이상에서 골다공증 유병률이 남성은 1%, 여성은 9%로 여성 유병률이 남성대비 9배나 높게 나타난 것으로 보고되었다.
- [11] 골다공증에 의해 야기되는 골절은 주된 건강 문제를 구성하며 건강 관리 시스템 상에 막대한 경제적 부담을 준다. 골다공증으로 인한 골절의 위험은 서양에서 높으며(여성에서 약 50% 및 남성에서 약 20%), 골절은 현저한 치사율 및 이환율과 연관된다. 피질골(cortical bone)은 신체에서 뼈의 약 80%를 구성하며, 여러 연구들은 피질골이 뼈 강도의 주요 결정인자이며, 이에 따라 골절 민감성의 주요 결정인자임을 보여주었다. 65세 이후에 뼈 손실은 해면질골이 아니라 주로 피질골에서의 손실에 기인한다(Lancet, 2010, May 15; 375(9727):1729-36).
- [12] 골격은 뼈 형성 골아세포(OBs) 및 뼈흡수 파골 세포(OCLs)에 의해 리모델링된다. 대식세포 콜로니 자극인자(M-CSF)는 OCLs 전구세포의 증식 및 생존을 증가시킬뿐만 아니라 OCL에서 핵인자- κ B(RANK)의 리셉터 활성화제의 발현을 상향조절한다. 이는 RANK 리간드(RANKL)가 바인딩하고 OCL 형성을 이끄는 시그널링 캐스케이드를 개시하도록 한다. RANKL의 영향은 RANKL에 대한 유인 리셉터인 오스테오프로테게린(OPG)에 의해 저해될 수 있다.

- [13] 또한, 최근 빠른 경제 성장과 식생활의 서구화와 함께 유전적, 환경적 요인 등으로 인한 비만 및 당뇨 등의 대사성 질환이 증가하고 있는 추세이다. 이를 예방 및 치료할 수 있는 물질들에 대한 연구들이 진행되고 있는 가운데 최근 다양한 기능성 식품 개발이 요구되고 있다.
- [14] 비만은 전 세계적으로 유병률이 늘어나고 있으며, 비만으로 인한 대사 관련 합병증으로 인해 비만 치료에 대한 관심이 고조되고 있다. 현재 사용되고 있는 비만 치료제는 포만감을 유도하여 식욕을 억제시키거나 지방의 흡수를 저하시켜 체중 감소를 유도한다. 포만감은 노르에피네프린 혹은 세로토닌의 신경 접합부에서 이러한 신경전달물질의 농도를 증가시킴으로써 유발되기도 하고, 세로토닌 수용체나 아드레날린성 수용체를 자극하여 유발되기도 한다.
- [15] 그러나 비만 치료를 위해 개발된 약물들은 효과에 비해 부작용이 심각하므로, 항비만 효과는 뛰어나면서도 부작용이 적은 소재의 새로운 작용기전을 가진 물질의 개발이 절실히 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [16] 이에 본 발명자들은 전국에서 수집된 김치시료에서 분리 및 동정을 통해 신규한 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) 균주를 분리하고, 김치로부터 분리한 락토바실러스 사케이 균주와 그의 배양액이 파골세포 분화 억제, 골다공증 질환 개선, 지방세포 분화 억제 및 체중 증가 억제 효과를 나타냄을 확인하였다.
- [17] 이에, 본 발명의 목적은 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 제공하는 것이다.
- [18] 본 발명의 다른 목적은 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 배양액을 제공하는 것이다.
- [19] 본 발명의 또 다른 목적은 김치 추출물을 배양하는 배양 단계를 포함하는, 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 분리 방법을 제공하는 것이다.
- [20] 본 발명의 또 다른 목적은 골 질환 또는 대사성 질환 개선, 예방 또는 치료 활성을 가지는 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 제공하는 것이다.
- [21] 본 발명의 또 다른 다른 목적은 골 질환 또는 대사성 질환 개선, 예방 또는 치료 활성을 가지는 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 배양액을 제공하는 것이다.
- [22] 본 발명의 또 다른 목적은 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 배양액을 포함하는 골 질환 또는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [23] 본 발명의 또 다른 목적은 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스

사케이 CVL-001 균주의 배양액을 포함하는 꿀 질환 또는 대사성 질환 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

- [24] 본 발명의 또 다른 목적은 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 꿀 질환 또는 대사성 질환 개선, 예방 및 치료 용도에 관한 것이다.

과제 해결 수단

- [25] 본 발명은 신규한 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CVL-001 균주, 이의 분리 방법, 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 꿀 질환 또는 대사성 질환 개선, 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [26] 본 발명자들은 김치 추출물을 배양하여 균주를 분리하고, 이로부터 그람 양성이고 카탈라제 음성인 균주를 선별하여 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 분리하였고, 상기 균주 또는 그의 배양액이 과꿀세포의 분화를 억제시키고 꿀 질환을 치료하는 효과가 있음을 확인하였으며, 이를 고지방식으로 비만 유도된 마우스에 대하여 경구 투여한 결과, 체중 증가가 억제되고 혈당 수치가 감소하는 것을 관찰하였다.
- [27] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [28] 본 발명의 일 양태는 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주이다.
- [29] 상기 균주는 서열번호 1로 표시되는 16S rRNA 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [30] 본 발명의 다른 양태는 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 배양액이다.
- [31] 상기 균주는 서열번호 1로 표시되는 16S rRNA 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [32] 본 발명의 또 다른 양태는 김치 추출물을 배양하는 배양 단계를 포함하는, 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 분리 방법이다.
- [33] 상기 김치 추출물은 김치를 마쇄하여 거른 김치 마쇄액인 것일 수 있고, 예를 들어, 상기 김치 마쇄액에 물을 첨가하여 희석한 김치액인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [34] 상기 배양 단계는 김치 추출물을 배양하는 제1 배양 단계; 및 상기 제1 배양 단계에서 분리한 균주를 배양하는 제2 배양 단계인 것일 수 있다.
- [35] 상기 제1 배양 단계는 유산균 감별을 위해 0.5 내지 2%의 탄산칼슘 또는 0.004 내지 0.006%의 브로모크레졸퍼플(bromocresol purple)이 첨가된 배지에서 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 탄산칼슘이 첨가된 배지에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [36] 상기 제1 배양 단계는 20 내지 32°C에서 36 내지 60시간 동안 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 30°C에서 48시간 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이후 투명환을 형성한 균주를 분리하여 이에 대하여 제2 배양

- 단계를 적용할 수 있다.
- [37] 상기 제2 배양 단계는 분리된 균주 중 유산균을 선별하여 배양하는 단계인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 분리된 균주 중 그람 양성이고 카탈라제 음성인 것을 유산균으로 선별하여 배양하는 단계인 것일 수 있다.
- [38] 상기 제2 배양 단계는 20 내지 32°C에서 12 내지 36시간 동안 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 30°C에서 24시간 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [39] 본 발명의 또 다른 양태는 골 질환 개선, 예방 또는 치료 활성을 가지는 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주이다. 상기 균주는 김치로부터 분리된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [40] 본 발명의 또 다른 양태는 골 질환 개선, 예방 또는 치료 활성을 가지는 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 배양액이다.
- [41] 본 발명의 또 다른 양태는 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.
- [42] 상기 골 질환은 골다공증(osteoporosis), 뼈전이암(bone metastatic cancer), 골연화증(osteomalacia), 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 대사성 골질환 및 치주질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 예를 들어, 골다공증일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [43] 상기 배양액은, 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 배양하고, 균주를 제거한 후 수득된 배양 상층액, 이의 농축물, 이의 분획물 또는 이의 동결건조물인 것일 수 있다.
- [44] 상기 배양액은 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 12시간 내지 30시간, 12시간 내지 24시간, 18시간 내지 30시간 또는 18시간 내지 24시간, 예를 들어, 22시간 내지 26시간 동안 배양하여 수득한 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 배양 시간은 24시간을 기점으로 하여 그 이상 배양하는 것이 배양 시간 의존적으로 파골세포 분화 억제 활성에 대하여 현저한 상승효과를 나타내는 것은 아니다.
- [45] 상기 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 배양을 위해서는 Alpha-MEM 배지를 이용할 수 있다.
- [46] 구체적으로, BME(Basal Media Eagle) 배지는 세포성장에 필요한 필수 영양분 및 무기염류와 비타민류에 대한 연구의 결과로 얻어진 배지로 현재 널리 사용되는 MEM과 DMEM의 기본조성이 된 배지이며, MEM(Minimum Essential Media Eagle) 배지는 BME에 비해서 아미노산의 농도가 더 높고 CO₂/NaHCO₃의 완충 작용을 위해 Earle's salts를 포함하고 있다. 세포 종류에 따라서 비필수아미노산이 더 첨가된 배지와 Earle's salts 대신 Hank's salts가 포함된 배지를 사용하기도 한다. Alpha MEM(MEM, Alpha modification)은 아미노산,

- 비타민 등이 추가로 첨가되어 있어 동물세포의 DNA 형질전환에 유용하다.
- [47] 상기 조성물은 배양액을 50 내지 400, 50 내지 350, 50 내지 300, 50 내지 250, 100 내지 400, 100 내지 350, 100 내지 300, 100 내지 250, 150 내지 400, 150 내지 350, 150 내지 300, 150 내지 250, 180 내지 400, 180 내지 350 또는 180 내지 300 ul/ml, 예를 들어, 180 내지 250 ul/ml의 농도로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [48] 상기 배양액은 pH 6.5 내지 8.5, 6.5 내지 8.0, 6.5 내지 7.5, 7.0 내지 8.5 또는 7.0 내지 8.0, 예를 들어, pH 7.0 내지 7.5인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [49] 배양액에서는 유산균이 자라면서 젖산 등의 대사체를 생산하게 되어 산성화될 수 있고, 이는 세포 배양에 적절하지 않은 pH 범위에 해당한다. 이러한 점에 근거하여, 세포 배양에 있어서 가장 적절한 pH 값은 7.4이다.
- [50] 상기 골 질환 예방 및 치료는 파골세포 분화 억제를 통해 달성되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [51] 본 발명의 또 다른 양태는 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.
- [52] 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 심혈관질환 및 고인슐린혈증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [53] 상기 약학적 조성물은 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 5×10^5 내지 5×10^{12} CFU/ml, 5×10^6 내지 5×10^{11} CFU/ml 또는 5×10^7 내지 5×10^{10} CFU/ml, 예를 들어, 5×10^8 내지 5×10^9 CFU/ml의 농도인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [54] 상기 배양액은 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 12시간 내지 30시간, 12시간 내지 24시간, 18시간 내지 30시간 또는 18시간 내지 24시간, 예를 들어, 22시간 내지 26시간 동안 배양하여 수득한 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 배양 시간은 24시간을 기점으로 하여 그 이상 배양하는 것이 배양 시간 의존적으로 체중 증가 억제 또는 혈당 수치 감소 효과에 대하여 현저한 상승효과를 나타내는 것은 아니다.
- [55] 상기 배양액은, 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 배양하고, 균주를 제거한 후 수득된 배양 상층액, 이의 농축물, 이의 분획물 또는 이의 동결건조물인 것일 수 있다.
- [56] 상기 배양액은 pH 6.5 내지 8.5, 6.5 내지 8.0, 6.5 내지 7.5, 7.0 내지 8.5 또는 7.0 내지 8.0, 예를 들어, pH 7.0 내지 7.5인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [57] 배양액에서는 유산균이 자라면서 젖산 등의 대사체를 생산하게 되어 산성화될 수 있고, 이는 세포 배양에 적절하지 않은 pH 범위에 해당한다. 이러한 점에 근거하여, 세포 배양에 있어서 가장 적절한 pH 값은 7.4이다.

- [58] 본 발명의 약학적 조성물은 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 배양액의 약학적 유효량 및/또는 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물로 이용될 수 있다.
- [59] 본 명세서에서 용어 "약학적 유효량"은 상술한 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 배양액의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [60] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [61] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예컨대, 경구, 피부, 정맥, 근육, 피하 등의 경로로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 경구로 투여될 수 있다.
- [62] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.
- [63] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 캡셀제 또는 젤(예컨대, 하이드로젤) 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [64] 본 발명의 또 다른 양태는 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 골 질환 개선용 식품 조성물이다.
- [65] 상기 골 질환은 골다공증, 뼈전이암, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 대사성 골질환 및 치주질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 예를 들어, 골다공증일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [66] 상기 배양액은, 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 배양하고, 균주를 제거한 후 수득된 배양 상층액, 이의 농축물, 이의 분획물 또는 이의 동결건조물인 것일 수 있다.
- [67] 상기 배양액은 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 12시간 내지 36시간,

- 12시간 내지 30시간, 12시간 내지 24시간, 18시간 내지 36시간, 18시간 내지 30시간 또는 18시간 내지 24시간, 예를 들어, 22시간 내지 26시간 동안 배양하여 수득한 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [68] 상기 조성물은 배양액을 20 내지 400, 20 내지 350, 20 내지 300, 20 내지 250, 50 내지 400, 50 내지 350, 50 내지 300, 50 내지 250, 100 내지 400, 100 내지 350, 100 내지 300, 100 내지 250, 150 내지 400, 150 내지 350, 150 내지 300, 150 내지 250, 180 내지 400, 180 내지 350 또는 180 내지 300 ul/ml, 예를 들어, 180 내지 250 ul/ml의 농도로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [69] 상기 배양액은 pH 6.5 내지 8.5, 6.5 내지 8.0, 6.5 내지 7.5, 7.0 내지 8.5 또는 7.0 내지 8.0, 예를 들어, pH 7.0 내지 7.5인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [70] 상기 골 질환 개선은 파골세포 분화 억제를 통해 달성되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [71] 본 발명의 또 다른 양태는 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 대사성 질환 개선용 건강기능식품 조성물이다.
- [72] 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 심혈관질환 및 고인슐린혈증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [73] 상기 건강기능식품 조성물은 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 5×10^5 내지 5×10^{12} CFU/ml, 5×10^6 내지 5×10^{11} CFU/ml 또는 5×10^7 내지 5×10^{10} CFU/ml, 예를 들어, 5×10^8 내지 5×10^9 CFU/ml의 농도인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [74] 상기 배양액은 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 12시간 내지 36시간, 12시간 내지 30시간, 12시간 내지 24시간, 18시간 내지 36시간, 18시간 내지 30시간 또는 18시간 내지 24시간, 예를 들어, 22시간 내지 26시간 동안 배양하여 수득한 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [75] 상기 배양액은, 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 배양하고, 균주를 제거한 후 수득된 배양 상층액, 이의 농축물, 이의 분획물 또는 이의 동결건조물인 것일 수 있다.
- [76] 상기 배양액은 pH 6.5 내지 8.5, 6.5 내지 8.0, 6.5 내지 7.5, 7.0 내지 8.5 또는 7.0 내지 8.0, 예를 들어, pH 7.0 내지 7.5인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [77] 본 발명의 식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 식품 조성물은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다.
- [78] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의

예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

- [79] 상기 음료는 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [80] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

발명의 효과

- [81] 본 발명은 신규한 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 및 이의 분리 방법에 관한 것으로서, 상기 균주는 김치로부터 분리할 수 있는 유산균이므로, 이를 효과적으로 생균제 또는 식품 첨가제로서 이용할 수 있다.
- [82] 또한, 본 발명은 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주(*Lactobacillus sakei*) 또는 이의 배양액을 포함하는 골 질환 또는 대사성 질환 개선, 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 김치로부터 분리한 락토바실러스 사케이 균주와 그의 배양액이 파골세포 분화 억제, 골다공증 질환 개선, 지방세포 분화 억제 및 체중 증가 억제 효과를 나타내므로, 이를 효과적으로 골다공증 또는 비만 질환의 개선, 예방 또는 치료에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [83] 도 1a는 락토바실러스 사케이 CVL-001(*Lactobacillus sakei*) 균주 배양액의 파골세포 분화 억제 효과를 나타내는 사진이다.
- [84] 도 1b는 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 배양액의 파골세포 분화 억제 효과를 나타내는 그래프이다.
- [85] 도 2는 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 배양액의 파골세포 분화 유도 단백질의 인산화 억제 효과를 나타내는 웨스턴 블로팅 결과 사진이다.
- [86] 도 3은 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 배양액의 파골세포 분화 유도 유전자의 발현 억제 효과를 나타내는 그래프이다.
- [87] 도 4는 골다공증을 유도한 마우스 모델에서 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 및 이의 배양액으로 인한 골밀도 증가 효과를 나타낸 그래프이다.

- [88] 도 5는 락토바실러스 사케이 CVL-001 배양액의 지방세포 분화에 대한 억제 효과를 나타내는 그래프이다.
- [89] 도 6은 고지방식이 실험군에서의 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주에 의한 체중 억제 효과를 시간 경과에 따라 나타낸 그래프이다.
- [90] 도 7은 고지방식이 실험군에서의 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주에 의한 부고환 지방 무게 감소 효과를 실험군에 따라 나타낸 그래프이다.
- [91] 도 8은 고지방식이 실험군에서의 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 배양액에 의한 체중 억제 효과를 시간 경과에 따라 나타낸 그래프이다.
- [92] 도 9는 고지방식이 실험군에서의 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 배양액에 의한 부고환 지방 무게 감소 효과를 실험군에 따라 나타낸 그래프이다.
- [93] 도 10은 고지방식이 실험군에서의 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 배양액에 의한 당부하검사에서의 혈당 강하 효과를 실험군에 따라 나타낸 그래프이다.
- [94] 도 11은 고지방식이 실험군에서의 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주에 의한 당부하검사에서의 혈당 강하 효과를 실험군에 따라 나타낸 그래프이다.
- [95] 도 12는 고지방식이 실험군에서의 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 배양액에 의한 인슐린부하검사에서의 혈당 강하효과를 실험군에 따라 나타낸 그래프이다.
- [96] 도 13은 고지방식이 실험군에서의 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주에 의한 인슐린부하검사에서의 혈당 강하효과를 실험군에 따라 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [97] 본 발명은 수탁번호 KCTC13816BP 로 기탁된, 골 질환 또는 대사성 질환 개선, 예방 또는 치료 활성을 가지는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CVL-001 균주에 관한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [98] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [99] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.

[100]

[101] 실시예 1. 균주의 분리

- [102] 전국에서 담금 직후의 배추김치를 수집하였으며, 수집된 김치는 6±0.5°C에서 0주부터 5주까지 저장하면서 유산균 분리를 위한 김치시료로 사용하였다. 상기 김치 500 g을 핸드 블렌더(hand blender, Hanil Co, Korea)로 마쇄하고, 이를 멸균거즈로 거른 김치액에 멸균수를 추가하여 10¹배 내지 10⁷배의 순차적인

배율로 희석하였다. 최종적으로는 10^7 배로 희석된 김치액 도말 배지를 분리하였다.

- [103] 희석한 김치액을 탄산칼슘(CaCO_3)이 2% 첨가된 MRS 배지(Difco Co., France)배지에 도말하고, 30°C 에서 48시간 동안 배양한 다음, 투명환을 형성한 균주를 분리하였다. 상기 분리된 균주에 대해 그람 염색(Gram stain kit, BD Co., USA)과 카탈라제 테스트(Biomérieux Co., France)를 수행하여, 그람 양성이고, 카탈라제 음성인 집락을 유산균으로 잠정적으로 확인하였다.
- [104] 상기 분리된 유산균주들은 MRS 액체배지에 접종한 후, 30°C 에서 24시간 동안 배양하여 글리세롤(glycerol)을 25%(v/v)가 되게 첨가하여 글리세롤 스탁(stock)을 만들어 -70°C 에서 보관하며 사용하였다.
- [105]
- [106] **실시예 2: 유산균주의 동정**
- [107] 최종 선정된 유산균 락토바실러스 사케이 CVL-001(*Lactobacillus sakei*)은 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 동정을 수행하였다. 분리 균주는 순수분리한 후 MRS 플레이트(plate)상태로 냉장택배를 이용하여 솔젠티(대전)에 의뢰하였고, 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')의 유니버설 프라이머 세트(universal primer set)를 사용하여 16S rRNA 염기서열 분석을 수행하였다.
- [108] 상기 분리 균주 락토바실러스 사케이 CVL-001의 16S rRNA 코딩 염기서열로 총 1,439bp의 염기서열을 결정하였으며, 그 결과를 표 1에 나타내었다.

[109] [표1]

서열 번호	명칭	서열
1	락토바실러스 사케이 CVL-001의 16S rRNA 코딩 염기서열	GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTTCGTGA GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC CTTATTACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACT CTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA GGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTA TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGG TACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTTTAGCTA ATCTCTTAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGG CTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTA GTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACC ATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCCGGTGAGGT AACCTTCGGGGAGCCAGCCG
2	27F 정방향 프라이머	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
3	1492R 역방향 프라이머	GGTTACCTTGTTACGACTT

[110] 상기 수행한 염기서열을 기초로 염기서열의 상동성 검사는 등록된 정보(GeneBank database)를 대상으로 블라스트 프로그램(Blast program, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 의해 실행하였다. 그 결과 락토바실러스 사케이 LZ217(*Lactobacillus sakei* LZ217)와 99%의 상동성을 나타내어, 락토바실러스 사케이 LZ217로 최종 동정하였다.

[111] 상기한 결과, 즉, 형태학적 특성, 당대사능 및 16S rRNA 염기서열 분석 결과, 만니톨(mannitol) 생성능 및 김치액 내 생존율(우점율)이 우수한 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주는 락토바실러스 사케이 LZ217으로 동정되었다.

[112] 그 결과 분리 균주를 락토바실러스 사케이 CVL-001로 명명하였고, 대한민국 전라북도 정읍시 신정동 823 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다.

[113]

[114] 실시예 3: 락토바실러스 사케이 CVL-001균주 배양액의 제조

[115] 세포에 처리하기 위한 배양액을 제조하기 위하여 alpha-MEM 배지에 락토바실러스 사케이 CVL-001를 24시간 동안 배양하고 원심분리 후 상층액을 분리하여 pH 7.4로 맞추었다.

[116]

- [117] 실시예 4: 락토바실러스 사케이 CVL-001균주 배양액의 파골세포 분화에 대한 억제 평가
- [118] 마우스 대식세포를 12 웰 플레이트(well plate)에 2×10^5 /웰의 밀도로 24시간 동안 배양하였으며 소태아혈청(fetal bovine serum; 이하 FBS), 1% 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-Streptomycin; 이하 PS), 대식세포 콜로니 자극인자(macrophage colony stimulating factor; 이하 M-CSF)가 첨가된 배지로 교체해준 후 배양액(50, 100, 200 ul/ml)을 2시간 동안 처리하였다. 이후 RANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)을 100 ng/ml 처리하여 24시간 동안 반응시키고, 위와 같은 방법으로 6일 동안 분화시켰다.
- [119] 이후 파골세포의 세포 화학적 표지효소인 타르타르산염 저항성 산성 포스파테이스(Tartrate resistance acid phosphatase; 이하 TRAP)에 발색성 기질을 첨가하여 핵을 염색하였고 핵이 3개 이상으로 다핵화된 세포를 관찰하고 이미지화하였다.
- [120] 대식세포에 RANKL을 처리하면 RANK에 결합하며 TRAP 양성 세포로 분화하게 된다. TRAP 양성세포에 RANKL, TNF- α 와 같은 염증인자로 자극하면 세포끼리 융합되어 다핵형 TRAP 양성 세포로 분화된다.
- [121] 도 1a, 1b 및 표 2에서 확인할 수 있듯이, 대식세포에 RANKL을 처리했을 때 파골세포로의 분화가 증가하였으며 배양액 처리에 의해서 파골세포의 수가 현저히 농도 의존적으로 감소했음을 확인했다. 이것으로 보아 락토바실러스 사케이 CVL-001 배양액이 파골세포로의 분화를 억제시킴을 확인할 수 있었다.
- [122] [표2]

RANKL	-	-	+	+	+	+
배양액	-	200	-	50	100	200
파골세포의 수(평균)	0	0	1,165	151	10	0

- [123]
- [124] 실시예 5: 락토바실러스 사케이 CVL-001균주배양액의 파골세포 분화 유도 단백질 발현에 대한 억제 평가
- [125] 마우스 대식세포에 RANKL 및 배양액을 처리했을 때 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 및 NF- κ B 신호기전을 확인하고자 하였다. 마우스 대식세포를 12 웰 플레이트에 4×10^5 /웰의 밀도로 24시간 동안 배양하였다. FBS, 1% PS, M-CSF가 첨가된 배지로 교체해 준 후 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 배양액(100 ul/ml)을 2시간 동안 처리해주었다. 이후 RANKL을 100 ng/ml 처리하여 0, 5, 15 및 30분 동안 반응시켰다.
- [126] 배지를 제거하고 단백질 용해 버퍼(Protein lysis buffer)를 이용하여 단백질을 추출한 후 정량하여, 30 μ g의 단백질을 SDS-PAGE 겔(gel)에서 분리하였다.

단백질을 멤브레인(membrane)으로 옮긴 후 1차, 2차 항체(p-jnk(Cell Signaling Technology, #9251S), p-p38(Cell Signaling Technology, 9211S), p-ERK(santa cruz, sc-7383), Ikbalpha(Cell Signaling Technology, 9242S), p-p65(Cell Signaling Technology, 3031S))를 순차적으로 처리하여 키트(BIO-RAD, ECL solution detection kit)로 발현되면 기계(Chemidoc)로 측정하였다.

- [127] RANKL은 RANK에 결합하여 TRAF6를 통해서 MAPK 및 NF- κ B 단백질 발현을 증가시키고 여러 가지 전사인자들의 증가를 유도해 파골세포의 분화를 촉진시키게 된다. 따라서 이들 기전에 대해 락토바실러스 사케이 배양액이 파골세포 분화를 억제시키는지 확인하기 위해 MAPK 단백질인 ERK, JNK, p38의 인산화(phosphorylation)를 웨스턴 블랏(western blotting)을 통해서 확인하였다.
- [128] 그 결과 RANKL의 처리에 의하여 5분 및 15분째에 MAPK 단백질의 인산화가 증가했고 배양액 처리에 의해서 JNK, P38 및 ERK의 인산화가 감소했음을 확인하였다. 또한 I κ B 알파(alpha)의 분해는 억제되었으며 p65의 인산화는 억제되었다.
- [129] 도 2에서 확인할 수 있듯이, 락토바실러스 사케이 배양액은 JNK, P38 및 ERK의 인산화를 억제함으로써 파골세포로의 분화를 억제하는 것으로 확인되었다.
- [130]
- [131] **실시예 6: 락토바실러스 사케이 배양액의 파골세포 분화 유도 유전자 발현에 대한 억제 평가**
- [132] 락토바실러스 사케이 배양액을 마우스 대식세포에 처리하여 파골세포 분화 기전 관련 유전자인 TRAP, DC-STAMP, Cathepsin K, NFATc1에 대한 유전자 발현(gene expression)을 실시간(Real-time) PCR을 통해 확인하였다. 골수-유래 대식세포(bone marrow-derived macrophages; 이하 BMDMs)를 12 웰 플레이트에 1×10^5 /웰의 밀도로 24시간 동안 배양하였다. 1시간 동안 FBS가 없는 1% PS만 첨가된 배지를 처리해준 후 락토바실러스 사케이 배양액 100 ul/ml을 2시간 동안 처리해주었다. 이후 RANKL을 처리하여 24시간 동안 반응시켰다. 위와 같은 방법으로 3일 동안 분화시킨 후 트리졸(TRIZOL) 용액을 이용하여 세포 내 RNA를 분리하고 RNA 정량값을 토대로 RT 프리믹스(premix)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 프라이머를 이용하여 실시간 PCR을 통해 증폭시켰다.
- [133] 사용된 프라이머는 Mouse TRAP, DC-STAMP, Cathepsin K, NFATc1이고 대조군(Control) 유전자인 GAPDH와 비교하여 상대적인 양을 비교하였다.
- [134] 대식세포에 RANKL을 처리하면 RANK에 결합하여 TRAP 양성인 다핵화된 파골세포로 분화가 된다. 또한 파골세포로 분화하는데 중요한 전사 인자인 NFATc1을 활성화시키고 파골세포분화기전(osteoclastogenesis)에 관여하는 TRAP, Cathepsin K, DC-STAMP의 발현을 증가시킨다.
- [135] 도 3 및 표 3에서 확인할 수 있듯이, RANKL처리에 의하여 증가된 TRAP,

DC-STAMP, Cathepsin K, NFATc1의 발현이 락토바실러스 사케이 배양액 처리에 의해서 감소했음을 확인했다. 이것으로 보아 전사인자인 NFATc1의 활성을 감소시키고 그로 인해 파골세포 분화 기전 관련 유전자인 TRAP, DC-STAMP, Cathepsin K의 발현을 감소하여 파골세포로의 분화를 억제시킴을 확인할 수 있었다.

[136] [표3]

RANKL	-	+	-	+
배양액	-	-	+	+
TRAP	1	104,133	201.9	7,122
DC-STAMP	1	38,698	72	8,539
Cathepsin K	1	3,983	210	709
NFATc1	1	913,838	922	85,284

[137]

[138] 실시예 7: 마우스의 난소적출 수술을 통한 골다공증 동물 모델 유도

[139] 마우스 C57BL/6 암컷(7주령)을 사용하여 22±2°C 및 상대습도 50±10%, 12시간 명암 주기로 설정된 환경에서 플라스틱 케이지에 사육하였다. 마우스의 난소절제 이전에 동일 환경에서 약 1주 정도 사육 조건에 적응시켰다.

[140] 졸레틸(zoletil)과 럼펀(lumpun)을 근육 주사하여 마취한 후 난소 수술부위를 제모하고 소독하였다. 1 cm 가량의 피부를 절개하고 다른 장기에 손상이 가해지지 않도록 주의하여 자궁을 따라 난소를 확인하여 봉합용 실로 난소를 결찰한 뒤 양측의 난소를 모두 절제하였다. 난소 절제 후 각 장기를 봉합 내로 재위치 시킨 뒤 봉합용 실로 봉합하였다. 10일 이후부터 8주 동안 치료물질을 투여하였다.

[141] 유산균 투여군 제조: 락토바실러스 사케이는 전배양 및 본배양시킨 뒤 1x10⁷, 1x10⁸ 및 1x10⁹ cells/ml로 계산하여 경구투여하였다.

[142] 배양액 투여군 제조: 락토바실러스 사케이는 전배양 및 본배양시킨 뒤 1x10⁷, 1x10⁸ 및 1x10⁹ cells/ml로 계산하였다. 그리고 MRS 배지에 10배 희석하여 24시간 동안 30°C로 배양하였다. 그 다음 원심분리기를 이용하여 균을 가라앉힌 뒤 배양액인 상층액을 수집하여 pH 7.4로 맞추어 200 ul 경구투여하였다.

[143]

[144] 실험군은 아래와 같이 설정하였다.

[145] C57BL/6 마우스; 80 마리

[146] ① 난소 비절제 대조군(sham), 10마리, MRS 배지(대조군) 투여

[147] ② 난소 비절제 대조군, 10마리, 배양액 투여

[148] ③ 난소 비절제 대조군, 10마리, 유산균(Lactobacillus sakei) 1x10⁹ cells/ml 투여

[149] ④ 난소 절제 실험군(OVX), 10마리, MRS 배지 투여

- [150] ⑤ 난소 절제 실험군, 10마리, 배양액(1/4희석) 투여
 [151] ⑥ 난소 절제 실험군, 10마리, 배양액(1/2희석) 투여
 [152] ⑦ 난소 절제 실험군, 10마리, 배양액(원액) 투여
 [153] ⑧ 난소 절제 실험군, 10마리, 유산균 1×10^7 cells/ml 투여
 [154] ⑨ 난소 절제 실험군, 10마리, 유산균 1×10^8 cells/ml 투여
 [155] ⑩ 난소 절제 실험군, 10마리, 유산균 1×10^9 cells/ml 투여

[156]

[157] 실시예 8: 락토바실러스 사케이 유산균 및 그의 배양액 투여에 대한 골다공증 유도 마우스의 골밀도 평가

[158] 골밀도 측정은 이전의 단순 방사선 사진 촬영법이나 컴퓨터 단층 촬영법에 비해 고해상도 영상자료를 제공하는 마이크로 CT(microcomputed tomography)를 이용하였다.

[159] 실험 종료 후 마우스 다리를 포르말린에 고정시킨 뒤 대구경북첨단의료산업진흥재단 실험동물센터에 골밀도 분석을 의뢰하였다.

[160] 난소 절제된 마우스는 에스트로겐 결핍으로 인해 골밀도가 감소하는 것으로 알려져 있다. 따라서 난소 절제된 마우스 동물 모델은 골다공증 질환 연구에 많이 이용되고 있다.

[161] 도 4 및 표 4에서 확인할 수 있듯이, 난소 절제된 마우스 그룹(G4)은 Sham 군에 비해 유의적으로 골밀도가 감소하는 것으로 관찰되었다. 한편, 락토바실러스 사케이 균주와 그의 배양액은 농도 의존적으로 골밀도를 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 배양액 원액을 투여한 그룹(G7)과 높은 농도의 균을 투여한 그룹(G10)에서 난소를 절제하지 않은 Sham 군의 골밀도만큼 회복시키는 것으로 확인되었다.

[162] [표4]

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10
골밀도(평균)(mg/cc)	245.9	260.9	241.7	215.3	221.7	230.3	238.6	217.6	229.1	234.8

[163]

[164] 실시예 9: 김치로부터 분리된 락토바실러스 사케이 CVL-001 배양액을 이용한 지방세포 분화 억제 효과에 대한 실험 (in vitro)

[165] 9-1. 락토바실러스 사케이 CVL-001 배양액 제조

[166] 락토바실러스 사케이(*Lactibacillus sakei*) CVL-001 배양액을 제조하기 위해 DMEM 배지에 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 1×10^8 CFU/ml을 24시간 동안 배양하고 원심분리 후 상층액을 분리하여 pH 7.4로 조절하였다.

[167]

[168] 9-2. 미분화된 지방전구세포주 3T3-L1을 이용한 지방분화

- [169] ATCC(American type culture collection, USA)에서 구입한 3T3-L1 지방전구세포(preadipocyte cell)를 DMEM 배지에 10% 우아혈청(Bovine calf serum; BCS) 및 1% PS를 첨가하고 계대배양하여 유지하였다. 플레이트(plate)에 접종(seeding)한 후 밀도가 100%가 되었을 때를 -2 day로 지정하고, 2일 동안 더 배양하면서 배양된 플레이트 내의 모든 세포가 G1 세포주기 정지(arrest) 상태가 되도록 하였다.
- [170] 0 day부터 IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), 덱사메타손(Dexamethasone), 인슐린(Insulin, MDI)을 첨가하여 분화를 시작하였다. 2 day에는 인슐린만 포함된 배지로 교체하였다. 4 day부터는 10% 소태아혈청(Fetal bovine serum; FBS)이 들어간 배지로 2일 간격으로 교체하여 분화될 때까지 배양하였다.
- [171]
- [172] **9-3. 락토바실러스 사케이 CVL-001 배양액의 지방세포 분화에 대한 억제 평가 (Oil red O staining)**
- [173] 지방세포 분화는 배지 구성 성분을 우아혈청(Bovine calf serum; BCS)이 아닌 FBS로 교체했을 때부터 유도된다. 3T3-L1 세포는 12 웰 플레이트(well plate)에 5×10^5 cells/well의 밀도로 10% FBS, 1% PS가 첨가된 배지와 함께 접종하였다. 100%의 밀도로 세포가 자란 지점에서 2일 후, 0 day에 배양액(12.5, 25.0 및 50.0 %)을 2시간 동안 처리하고 지방 세포 분화 유도 물질 MDI를 처리하였다.
- [174] 배양액은 1×10^8 cfu/ml 농도의 *L. sakei*를 DMEM (High glucose) + FBS (10%) + PS (1%) 배지(media)에 24시간 동안 배양하여 제조하였고, 배양액 희석은 DMEM 배지를 이용하여 수행하였다.
- [175] 2 day에는, 배지를 교체하면서 배양액(12.5, 25.0 및 50.0 %)을 2시간 동안 처리한 후 인슐린을 처리하였다. 4 day에는, 배지를 교체하면서 배양액(12.5, 25.0 및 50.0 %)을 처리하였다. 2일 간격으로 분화될 때까지 동일한 과정을 반복하였다.
- [176] 분화된 지방세포가 관찰되면 염색을 위해 4% 포르말린으로 교체하여 10분 동안 세포를 고정시켰다. D.W로 2번 세척하고 Oil red O 염색 시약과 D.W를 6:4로 혼합하여 넣은 후 30분 동안 지방세포를 염색하였다. D.W로 세척 후 현미경으로 관찰한 뒤, 100% 이소프로판올(isopropanol)을 처리하여 Oil red O를 추출하였고 510 nm의 흡광도에서 측정하여 분화 정도를 정량적으로 분석하였다.
- [177] 도 5 및 표 5에서 확인할 수 있듯이, 3T3-L1 세포 성장 배지에 MDI를 첨가하면 지방세포로 분화하게 된다. 본 연구 결과에서는 3T3-L1 세포에 MDI를 처리했을 때 지방세포로의 분화가 증가하였으며 배양액 처리에 의해서 농도의존적으로 지방세포의 수가 현저히 감소했음을 확인하였다.

[178] [표5]

배양액(%)	-	12.5	25.0	50.0
지방세포 분화 정도	5.7052	4.1410	2.0922	2.0940

[179] 이로부터 락토바실러스 사케이 CVL-001 배양액은 지방세포로의 분화를 억제함을 확인할 수 있었다.

[180]

[181] 실시예 10: 비만 개선 효과의 확인을 위한 비만 마우스 동물 모델의 제조 (in vivo)

[182] 10-1. 락토바실러스 사케이 CVL-001 생균 제조

[183] 마우스에 처리하기 위한 생균을 제조하였다. 구체적으로, 고체 배지(MRS agar)에 24시간 동안 30°C에서 배양한 후 단일 콜로니(single colony)를 채취하여 액체 배지(MRS broth)에서 전배양을 진행하였다. 전배양은 5 ml 배지(media)에 150 rpm 30°C조건에서 24시간 동안 수행하였으며, 이후 10배로 희석하여 동일한 조건에서 3시간 동안 본배양을 진행하였다.

[184] 균수를 맞추기 위해 흡광도 600 nm에서 O.D 값 0.6이 나오도록 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 PBS에 농도를 맞췄다. 이는 유산균이 이 조건에서 0.89×10^9 CFU/ml 만큼 존재함을 의미한다. 마우스 개체마다 200 ul씩(1×10^8 CFU/mouse, 1×10^9 CFU/mouse) 투여할 것을 고려하여 3,000 RPM에 15분 조건으로 원심분리를 실시하여 생균 배지(media)를 제조하였다.

[185]

[186] 10-2. 락토바실러스 사케이 CVL-001 배양액 제조

[187] 본배양이 완료된 락토바실러스 사케이가 들어있는 MRS 배지를 10배 희석하여 150 rpm 30°C 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 3,000 RPM에 15분 조건으로 원심분리를 실시하여 상층액을 분리하고 pH 7.4로 조절하였다. 0.45 um 막여과지(membrane filter paper)로 여과한 후 4°C에서 보관하였다.

[188]

[189] 10-3. 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 및 배양액에 대한 항비만 실험(in vivo)

[190] 7주령의 C57BL/6 수컷 마우스에 생균(1일 단회 200 ul/개체), 배양액(1일 단회 200 ul/개체) 및 고지방식이(High Fat diet)를 투여하였다. 이후 2주 간격으로 체중을 측정하였다. 11주째에 혈당 검사를 실시하였고, 14주째에 부검하여 혈액을 채취하고 장기의 무게를 측정하였다.

[191]

[192] 균주 이용 실험에 이용된 그룹의 정보는 다음과 같다.

[193] G1: 대조군(Control Group, 표준식이(Normal diet) 급이) PBS(phosphate buffered saline) 경구투여 (n=6)

- [194] G2: 대조군 *L. sakei* 10⁹ 경구투여 (n=6)
- [195] G3: 고지방군(High Fat Group, 고지방식이 급이) PBS 경구투여 (n=8)
- [196] G4: 고지방군 *L. sakei* 10⁸ 경구투여 (n=8)
- [197] G5: 고지방군 *L. sakei* 10⁹ 경구투여 (n=8)
- [198]
- [199] 배양액 이용 실험에 이용된 그룹의 정보는 다음과 같다.
- [200] G1: 대조군 (표준식이 급이) MRS 경구투여(n=6)
- [201] G2: 대조군 배양액(원액) 경구투여 (n=6)
- [202] G3: 고지방군 (고지방식이 급이) MRS 경구투여 (n=8)
- [203] G4: 고지방군 배양액(1/2 희석) 경구투여 (n=8)
- [204] G5: 고지방군 배양액(원액)경구투여 (n=8)
- [205]
- [206] 실시예 11: 김치로부터 분리된 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주와 그의 배양액을 이용한 효과에 대한 실험 (in vivo)
- [207] 11-1. 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 또는 배양액에 의한 체중 변화의 확인(in vivo)
- [208] 60%의 지방으로 구성된 고지방식이를 마우스에 경구투여시키면 표준식이를 먹인 마우스에 비해 체중이 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서 고지방식으로 유도된 비만 마우스 동물 모델은 비만 질환 연구에 많이 이용되고 있다.
- [209] 도 6에서 확인할 수 있듯이, 고지방식이를 먹인 그룹(G3)에서 표준식이를 먹인 그룹(G1)에 비해 유의적으로 체중이 증가되는 것으로 관찰되었다. 특히 고지방식이와 함께 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 10⁸과 10⁹의 수로 먹인 그룹(G4 및 G5)에서 G3보다 유의적으로 체중이 감소되어 있는 것으로 나타났다.
- [210] [표6]

	G1	G2	G3	G4	G5
식이	표준	표준	고지방	고지방	고지방
균주	PBS	<i>L. sakei</i> 10 ⁹	PBS	<i>L. sakei</i> 10 ⁸	<i>L. sakei</i> 10 ⁹
무게(g)	0.80	0.85	2.29	2.23	1.93

- [211] 도 7 및 표 6에서 확인할 수 있듯이, 부고환 지방 무게 또한 고지방식이를 먹인 G3이 표준식이 그룹 G1보다 유의적으로 증가하였고, 고지방식이와 함께 균주 10⁹을 먹인 그룹 G5의 부고환 지방의 무게가 유의적으로 감소되어 있는 것을 확인하였다. 도 8에서 확인할 수 있듯이, 고지방식이를 먹인 그룹(G3)에서 표준식이를 먹인 그룹(G1)에 비해 유의적으로 체중이 증가되는 것이 관찰되었다. 특히 고지방식이와 함께 락토바실러스 사케이 CVL-001 배양액 원액(G5)을 먹인 그룹에서 G3보다 유의적으로 체중이 감소되어 있는 것으로 나타났다. 한편 배양액의 1/2를 투여한 그룹(G4)에서는 고지방식으로 유도된

체중증가를 억제시키지 못하는 것으로 나타났다.

[212] [표7]

	G1	G2	G3	G4	G5
식이	표준	표준	고지방	고지방	고지방
배양액	MRS	배양액 원액	MRS	배양액 1/2 희석액	배양액 원액
무게(g)	0.744	0.691	2.579	2.065	1.768

[213] 도 9 및 표 7에서 확인할 수 있듯이, 부고환 지방 무게 또한 고지방食이를 먹인 G3이 표준식이 그룹 G1 보다 유의적으로 증가되었고, 고지방食이와 함께 배양액 원액을 먹인 그룹 G5의 부고환 지방의 무게가 유의적으로 감소되어 있는 것을 확인하였다.

[214]

[215] **11-2. 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주와 배양액 투여에 대한 비만 유도 마우스의 공복시 혈당 평가 (Fasting Blood Sugar Test)**

[216] 마우스는 실험 전날 오후 9시부터 다음 날 9시까지 12시간 동안 공복 유지 후 혈당 검사를 수행하였다. 고지방食이를 먹인 마우스 동물 모델은 공복 시 혈당이 매우 높게 유지되는 것으로 알려져 있다. 실험군별 조건은 상기 2-3과 같은 조건으로 진행하였으며, 균주를 투여한 군과 배양액을 투여한 군을 각각 표 8 및 9로 나타내었다.

[217] [표8]

그룹	공복 혈당(Fasting blood glucose, mg/dL)
G1: ND + control	106.13±12.81 ^a
G2: ND + <i>L. sakei</i> 10 ⁹	96.00±16.49 ^a
G3: HFD + control	147.75±19.71 ^b
G4: HFD + <i>L. sakei</i> 10 ⁹	117.63±25.04 ^a
G5: HFD + <i>L. sakei</i> 10 ⁹	108.50±30.52 ^a

[218] 표 8에서 확인할 수 있듯이, 본 실시예에서 고지방食이를 먹인 G3 그룹은 표준食이를 먹인 그룹 G1에 비해 공복 시 혈당 수치가 상당히 높게 유지되어 있는 것으로 관찰되었다. 특히 고지방食이와 함께 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 농도를 각각 다르게 투여한 G4와 G5 그룹에서 G3보다 혈당수치가 감소되어 표준식이 먹이 그룹 G1과 비슷한 수준인 것으로 관찰되었다.

[219] [표9]

그룹	공복 혈당(Fasting blood glucose, mg/dL)
G1: ND + MRS	104.00±15.6 ^a
G2: ND + sup	110.25±20.8 ^a
G3: HFD + MRS	140.00±28.7 ^b
G4: HFD + sup(1/2)	129.38±23.52 ^b
G5: HFD + sup	106.75±15.23 ^{ab}

[220] 표 9에서 확인할 수 있듯이, 본 실시예에서 고지방식을 먹인 G3 그룹은 표준식을 먹인 그룹 G1에 비해 공복 시 혈당 수치가 상당히 높게 유지되어 있는 것으로 관찰되었다. 특히 고지방식과 함께 락토바실러스 사케이 CVL-001 배양액 원액을 투여한 G5 그룹에서 G3보다 혈당수치가 감소되는 경향을 보여 표준식을 먹인 그룹 G1과 비슷한 수준인 것으로 관찰되었다.

[221]

[222] **11-3. 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주와 배양액 투여에 대한 비만 유도 마우스의 당 부하 검사 (Glucose Tolerance Test)**

[223] 실험군별 조건은 상기 10-3과 같은 조건으로 진행하되, 마우스는 실험 전날 오후 9시부터 다음 날 9시까지 12시간 동안 공복 유지 후 다음 검사를 수행하였다. 0.2 um 여과장치(filteration)로 멸균시킨 10% 글루코스(Glucose)를 함유하는 PBS 용액을 준비하여 각 개체마다 2 mg(glucose/g. volume(ul)= body weight(g) x 20)씩 복강 투여(27-gauge sterile needle)하였다. 마우스를 케이지에 다시 넣고 혈당 수치를 0, 30, 60, 90 및 120분 간격으로 측정하였다. 혈당 검사는 꼬리에서 채혈하여 수행하여 표 10, 표 11, 도 10 및 도 11로 나타내었다.

[224] [표10]

그룹	0	30	60	90	120 (min)
Normal Diet MRS	110.60±17.5 2 ^a	239.60±35.7 0 ^a	170.40±32.9 9 ^a	114.60±5.75 a	97.00±12.38 a
Normal Diet sup	113.20±17.3 8 ^a	236.40±13.9 9 ^a	166.00±13.8 1 ^a	119.40±12.6 3 ^a	108.40±8.43 ab
High Fat Diet MRS	159.00±25.0 1 ^b	392.60±45.1 2 ^c	280.80±75.2 6 ^b	221.40±37.1 0 ^b	179.80±30.9 3 ^c
High Fat Diet sup(1/2)	121.20±25.0 5 ^a	407.20±36.3 5 ^c	252.40±66.9 0 ^b	213.20±47.4 1 ^b	171.60±52.8 3 ^c
High Fat Diet sup	119.80±19.2 3 ^a	327.00±45.8 3 ^b	246.80±36.9 9 ^b	185.20±16.0 9 ^b	145.40±9.69 bc

[225] 표 10 및 도 10에서 확인할 수 있듯이, 고지방식을 먹인 그룹(G3)에서 표준식을 먹인 그룹(G1)에 비해 유의적으로 혈당이 높게 유지되는 것이 관찰되었다. 특히 고지방식과 함께 락토바실러스 사케이 CVL-001 배양액 원액(G5)을 먹인 그룹에서 G3보다 30분에서 유의적으로 혈당이 감소되어 있는 것으로 나타났다. 한편 배양액의 1/2를 투여한 그룹(G4)에서는 고지방식으로 유도된 혈당증가를 억제시키지 못하는 것으로 나타났다.

[226] [표11]

그룹	0	30	60	90	120 (min)
Normal Diet PBS	89.00±11.58 a	261.80±41.7 0 ^a	175.40±28.0 8 ^a	136.60±21.0 0 ^a	114.40±10.5 9 ^a
Normal Diet L. sakei 10 ⁹	90.60±10.15 a	285.60±55.9 8 ^{ab}	188.80±35.7 2 ^{ab}	137.00±17.9 4 ^a	114.20±14.0 1 ^a
High Fat Diet PBS	163.20±21.2 3 ^c	352.60±68.4 4 ^b	236.00±54.1 7 ^b	194.00±39.2 8 ^b	155.40±3.72 b
High Fat Diet L.sakei 10 ⁸	124.00±26.5 1 ^b	335.00±38.3 0 ^{ab}	195.60±20.5 5 ^{ab}	167.20±34.3 2 ^{ab}	136.20±13.4 2 ^b
High Fat Diet L. sakei 10 ⁹	106.80±18.1 5 ^{ab}	296.00±33.7 5 ^{ab}	213.60±25.4 2 ^{ab}	163.60±21.2 7 ^{ab}	145.80±19.2 0 ^b

[227] 표 11 및 도 11에서 확인할 수 있듯이, 고지방식을 먹인 그룹(G3)에서 표준식을 먹인 그룹(G1)에 비해 유의적으로 혈당이 높게 유지되는 것이 관찰되었다. 특히 고지방식과 함께 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 10⁸과 10⁹의 수로 먹인 그룹(G4 및 G5)에서 G3보다 혈당이 감소되어 있는 것으로 나타났지만 유의적인 차이는 보이지 않았다.

[228]

[229] **11-4. 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주와 배양액 투여에 대한 비만 유도 마우스의 인슐린 부하 검사(Insulin tolerance Test)**

[230] 실험군별 조건은 상기 10-3과 같은 조건으로 진행하되, 마우스는 실험 당일 날 오전 9시부터 오후 1시까지 4시간 동안 공복 유지 후 다음 검사를 수행하였다. 2 mg/ml 인슐린(HCl을 희석하여 pH 3으로 맞춘 D.W 용액)을 준비하여 각 개체마다 1 U(0.03846 mg/kg. Volume(ul)= Body weight(g) x 20)씩 복강 투여(27-gauge sterile needle)하였다. 마우스를 케이지에 다시 넣고 혈당 수치를 0, 30, 60, 90 및 120분 간격으로 측정하였다. 혈당 검사는 꼬리에서 채혈하여 수행하였다.

[231] [표12]

그룹	0	30	60	90	120 (min)
Normal Diet MRS	130.00±10.0 6 ^a	74.60±9.77 ^a	67.20±15.45 a	66.80±14.19 a	70.80±8.30 ^a
Normal Diet <i>L.</i> <i>sakei</i> sup	130.20±6.58 a	75.60±11.48 a	68.80±24.21 a	65.00±19.83 a	74.60±19.30 a
High Fat Diet MRS	179.40±17.2 9 ^b	119.80±14.4 0 ^b	117.00±27.0 9 ^b	145.40±22.2 2 ^b	183.60±34.4 2 ^c
High Fat Diet <i>L.</i> <i>sakei</i> sup(1/2)	180.40±25.8 3 ^b	114.80±21.8 3 ^b	95.60±18.68 ab	129.40±62.9 4 ^b	119.40±38.7 1 ^b
High Fat Diet <i>L.</i> <i>sakei</i> sup	156.60±13.0 0 ^b	110.20±18.4 5 ^b	89.00±25.34 ab	71.00±20.00 a	83.40±18.52 ab

[232] 표 12 및 도 12에서 확인할 수 있듯이, 고지방식을 먹인 그룹(G3)에서 표준식을 먹인 그룹(G1)에 비해 유의적으로 혈당이 높게 유지되는 것이 관찰되었다. 특히 고지방식과 함께 락토바실러스 사케이 CVL-001 배양액 원액(G5)을 먹인 그룹에서 G3보다 90분 및 120분에서 유의적으로 혈당이 감소되어 있는 것으로 나타났다. 한편 배양액의 1/2를 투여한 그룹(G4)에서는 G3보다 120분에서 유의적으로 혈당이 감소되어 있는 것으로 나타났다.

[233] [표13]

그룹	0	30	60	90	120 (min)
Normal Diet PBS	140.40±16.1 4 ^a	96.60±13.48 ab	75.60±8.69 ^a	65.80±7.76 ^a	76.80±10.91 a
Normal Diet <i>L.</i> <i>sakei</i> 10 ⁹	126.40±13.2 0 ^a	77.20±9.41 ^a	69.00±13.80 a	56.20±14.30 a	66.20±12.89 a
High Fat Diet PBS	180.60±22.6 6 ^b	142.80±31.0 4 ^c	114.20±16.0 8 ^b	153.60±37.3 2 ^b	171.40±23.1 4 ^c
High Fat Diet <i>L.sakei</i> 10 ⁸	178.00±12.5 4 ^b	98.60±10.95 ab	81.20±19.05 a	83.20±17.68 a	115.80±34.0 8 ^b
High Fat Diet <i>L.</i> <i>sakei</i> 10 ⁹	177.20±28.2 2 ^b	121.00±19.1 7 ^{bc}	82.20±23.13 a	85.20±13.12 a	80.00±18.48 a

[234] 표 13 및 도 13에서 확인할 수 있듯이, 고지방식을 먹인 그룹(G3)에서 표준식을 먹인 그룹(G1)에 비해 유의적으로 혈당이 높게 유지되는 것이 관찰되었다. 특히 고지방식과 함께 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 10⁸과 10⁹의 수로 먹인 그룹(G4 및 G5)에서 G3보다 혈당이 0분을 제외한 모든 시간

대에서 유의적으로 감소되어 있는 것으로 나타났다.

산업상 이용가능성

- [235] 본 발명은 신규한 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CVL-001 균주 및 이의 분리 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 김치로부터 분리하여 동정한 신규한 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주에 관한 것이다.
- [236] 또한, 본 발명은 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 꿀 질환 개선, 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 신규한 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물의 꿀 질환 개선, 예방 또는 치료 효과에 관한 것이다.

[237]

1

국제용 양식
원기탁에 관한 수령
규정 7.1에 따른 발행

수신: 전남대학교 산학협력단
전남대학교
77, 용봉로, 목구, 광주 (우)61186
대한민국

I. 미생물의 명칭	
기탁자에 의해 주어진 명칭: <i>Lactobacillus sakei</i> CVL-001	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: KCTC 13816BP
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상 위치	
상기 I에 표시된 미생물에 다음을 첨부하였다. [] 과학적 성질 [] 분류학상 위치 (적용대상에 체크할 것)	
III. 수령 및 수탁	
본 국제기탁기관은 상기 I.에 표시된 미생물을 수탁 받고, 2019년 02월 19일 수령하였다.	
IV. 전환 요청의 수령	
상기 I.에 표시된 미생물은 본 국제기탁기관에 ()에 수탁되었고, 원 기탁의 부다페스트조약에 의한 기탁으로의 변환 요청이 ()에 수령되었다.	
V. 국제기탁기관	
명 칭: 생물자원센터 주 소: 한국생명공학연구원(KRIBB) 181, 입신길, 정읍시, 전라북도 (우)56212 대한민국	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가지거나 권한을 부여받은 담당자의 날인: 김성건, 센터장 날짜: 2019년 02월 19일

FORM BP/4 (KCTC Form 17)

단일

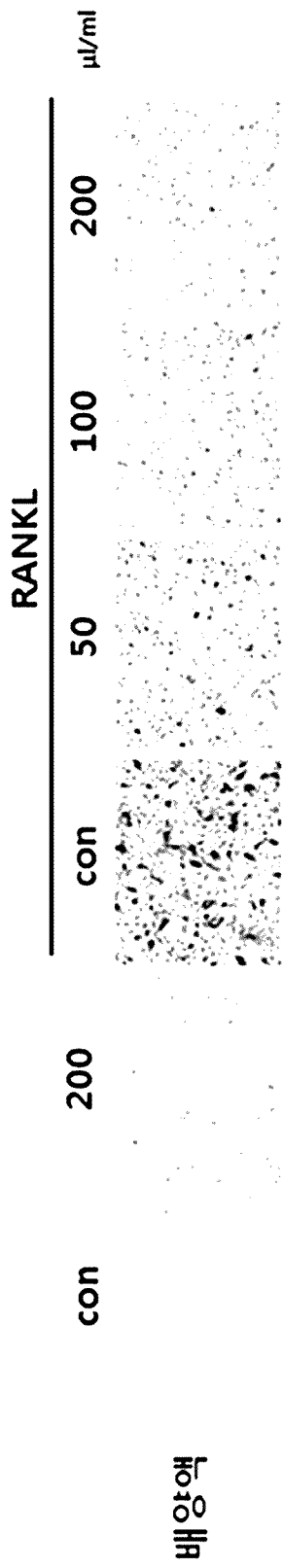
페이지

청구범위

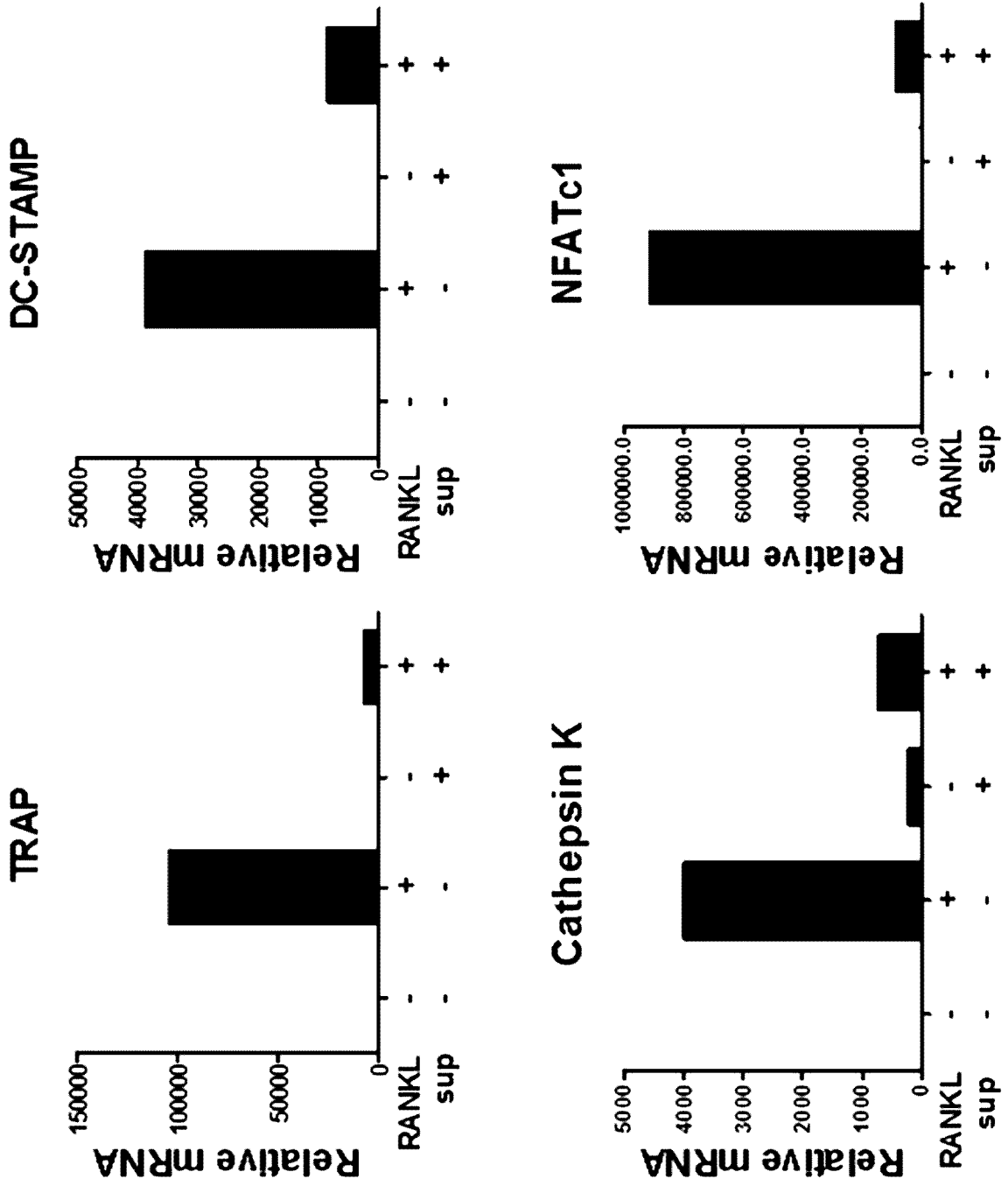
- [청구항 1] 수탁번호 KCTC13816BP 로 기탁된 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CVL-001 균주.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 균주는 서열번호 1로 표시되는 16S rRNA 서열을 가지는 것인, 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주.
- [청구항 3] 수탁번호 KCTC13816BP 로 기탁된 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CVL-001 균주의 배양액.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 균주는 서열번호 1로 표시되는 16S rRNA 서열을 가지는 것인, 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 배양액.
- [청구항 5] 김치 추출물을 배양하는 배양 단계를 포함하는, 수탁번호 KCTC13816BP 로 기탁된 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CVL-001 균주의 분리 방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 김치 추출물은 김치를 마쇄하여 거른 김치 마쇄액인 것인, 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 분리 방법.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 배양 단계는 김치 추출물을 배양하는 제1 배양 단계; 및 상기 제1 배양 단계에서 분리된 균주를 배양하는 제2 배양 단계인 것인, 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 분리 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 제1 배양 단계는 탄산칼슘이 첨가된 배지에서 수행되는 것인, 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 분리 방법.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 제1 배양 단계는 20 내지 32°C에서 36 내지 60시간 동안 수행되는 것인, 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 분리 방법.
- [청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 제2 배양 단계는 분리된 균주 중 그람 양성인 것을 선별하여 배양하는 단계인 것인, 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 분리 방법.
- [청구항 11] 제7항에 있어서, 상기 제2 배양 단계는 분리된 균주 중 카탈라제 음성인 것을 선별하여 배양하는 단계인 것인, 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 분리 방법.
- [청구항 12] 제7항에 있어서, 상기 제2 배양 단계는 20 내지 32°C에서 12 내지 36시간 동안 수행되는 것인, 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주의 분리 방법.
- [청구항 13] 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) CVL-001 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 골 질환 또는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 골 질환은 골다공증(osteoporosis), 뼈전이암(bone metastatic cancer), 골연화증(osteomalacia), 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 대사성 골질환 및 치주질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 15] 제13항에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨, 고혈압, 고지혈증,

- 심혈관질환 및 고인슐린혈증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 16] 제13항에 있어서, 상기 배양액은, 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 배양하고, 균주를 제거한 후 수득된 배양 상층액, 이의 농축물, 이의 분획물 또는 이의 동결건조물인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 17] 제13항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 5×10^5 내지 5×10^{12} CFU/ml의 농도로 포함하는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 18] 제13항에 있어서, 상기 배양액은 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 12시간 내지 30시간 동안 배양하여 수득한 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 19] 제13항에 있어서, 상기 조성물은 배양액을 50 내지 400 ul/ml의 농도로 포함하는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 20] 제13항에 있어서, 상기 배양액은 pH 6.5 내지 8.5인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 21] 수탁번호 KCTC13816BP로 기탁된 락토바실러스 사케이 CVL-001(*Lactobacillus sakei*) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 골 질환 또는 대사성 질환 개선용 식품 조성물.
- [청구항 22] 제21항에 있어서, 상기 골 질환은 골다공증(osteoporosis), 뼈전이암(bone metastatic cancer), 골연화증(osteomalacia), 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 대사성 골질환 및 치주질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 식품 조성물.
- [청구항 23] 제21항에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 심혈관질환 및 고인슐린혈증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 식품 조성물.
- [청구항 24] 제21항에 있어서, 상기 배양액은, 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 배양하고, 균주를 제거한 후 수득된 배양 상층액, 이의 농축물, 이의 분획물 또는 이의 동결건조물인 것인, 식품 조성물.
- [청구항 25] 제21항에 있어서, 상기 배양액은 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 12시간 내지 30시간 동안 배양하여 수득한 것인, 식품 조성물.
- [청구항 26] 제21항에 있어서, 상기 식품 조성물은 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주를 5×10^5 내지 5×10^{12} CFU/ml의 농도로 포함하는 것인, 식품 조성물.
- [청구항 27] 제21항에 있어서, 상기 조성물은 배양액을 50 내지 400 ul/ml의 농도로 포함하는 것인, 식품 조성물.
- [청구항 28] 제21항에 있어서, 상기 배양액은 pH 6.5 내지 8.5인 것인, 식품 조성물.

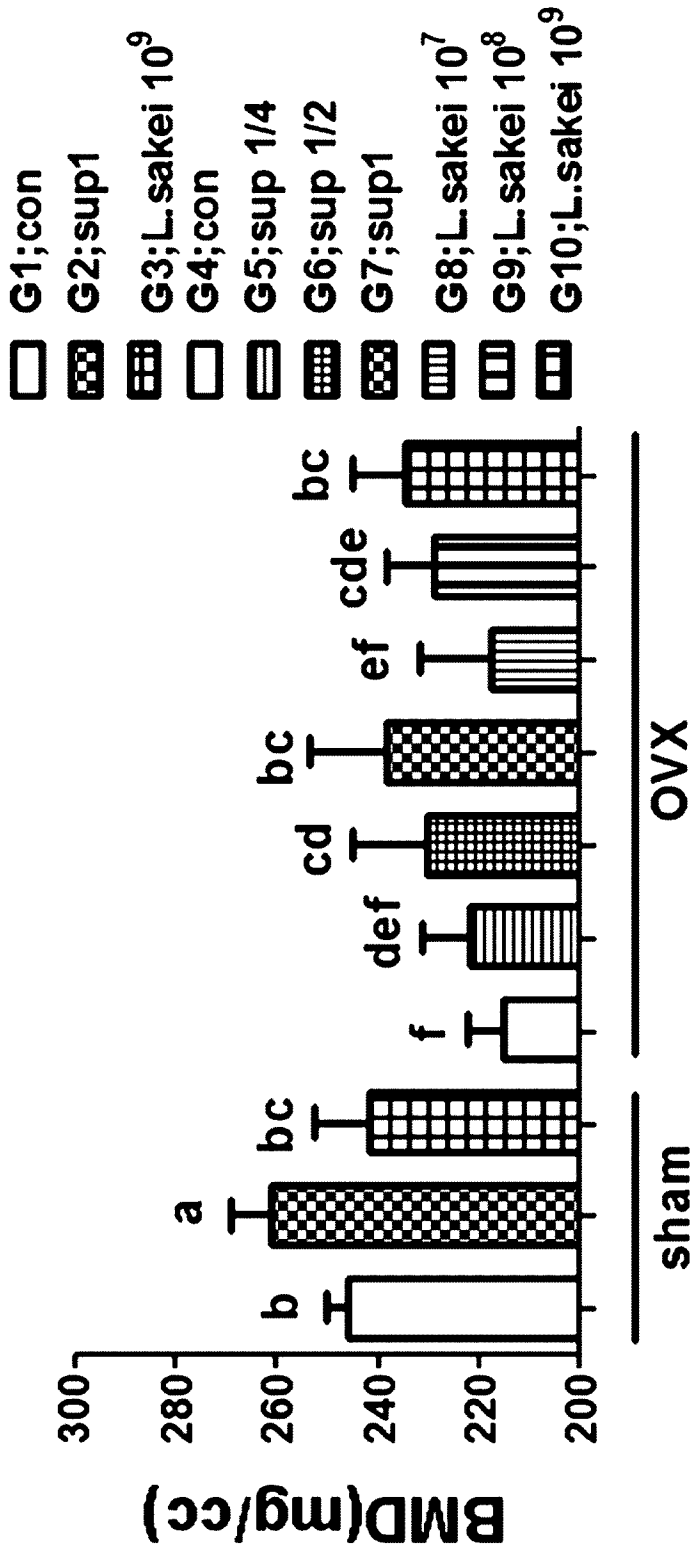
[도 1a]



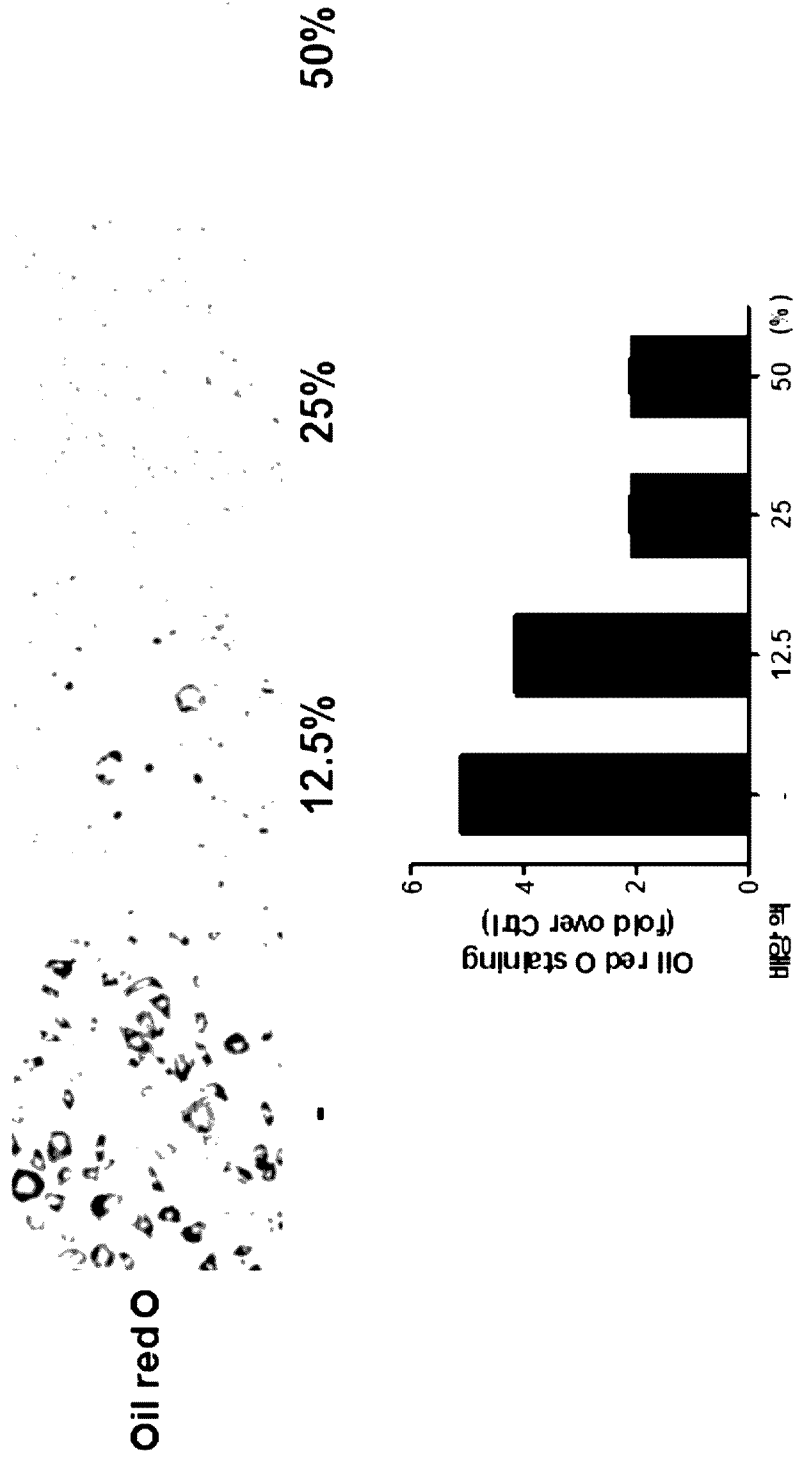
[도3]



[도4]

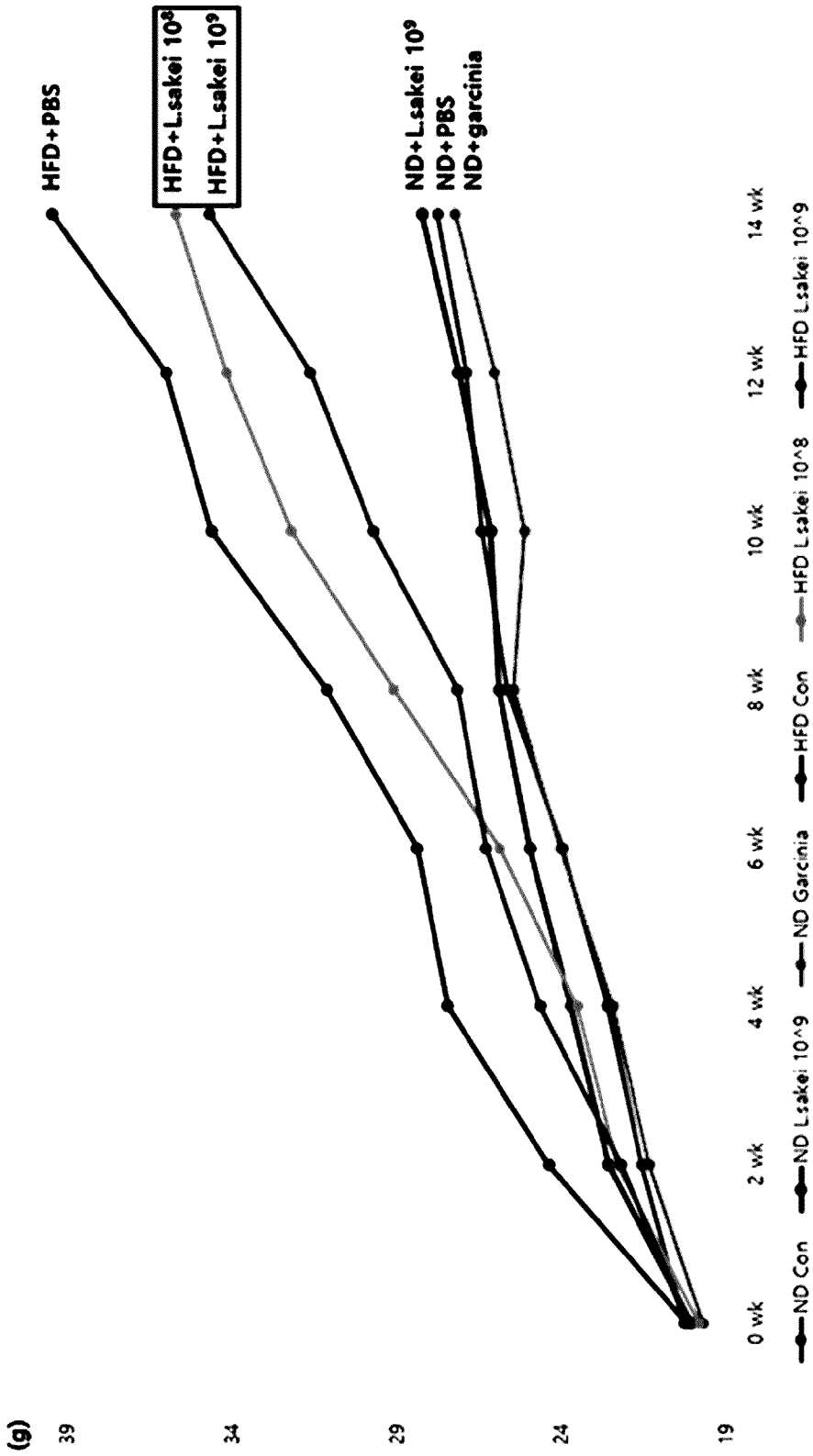


[도5]

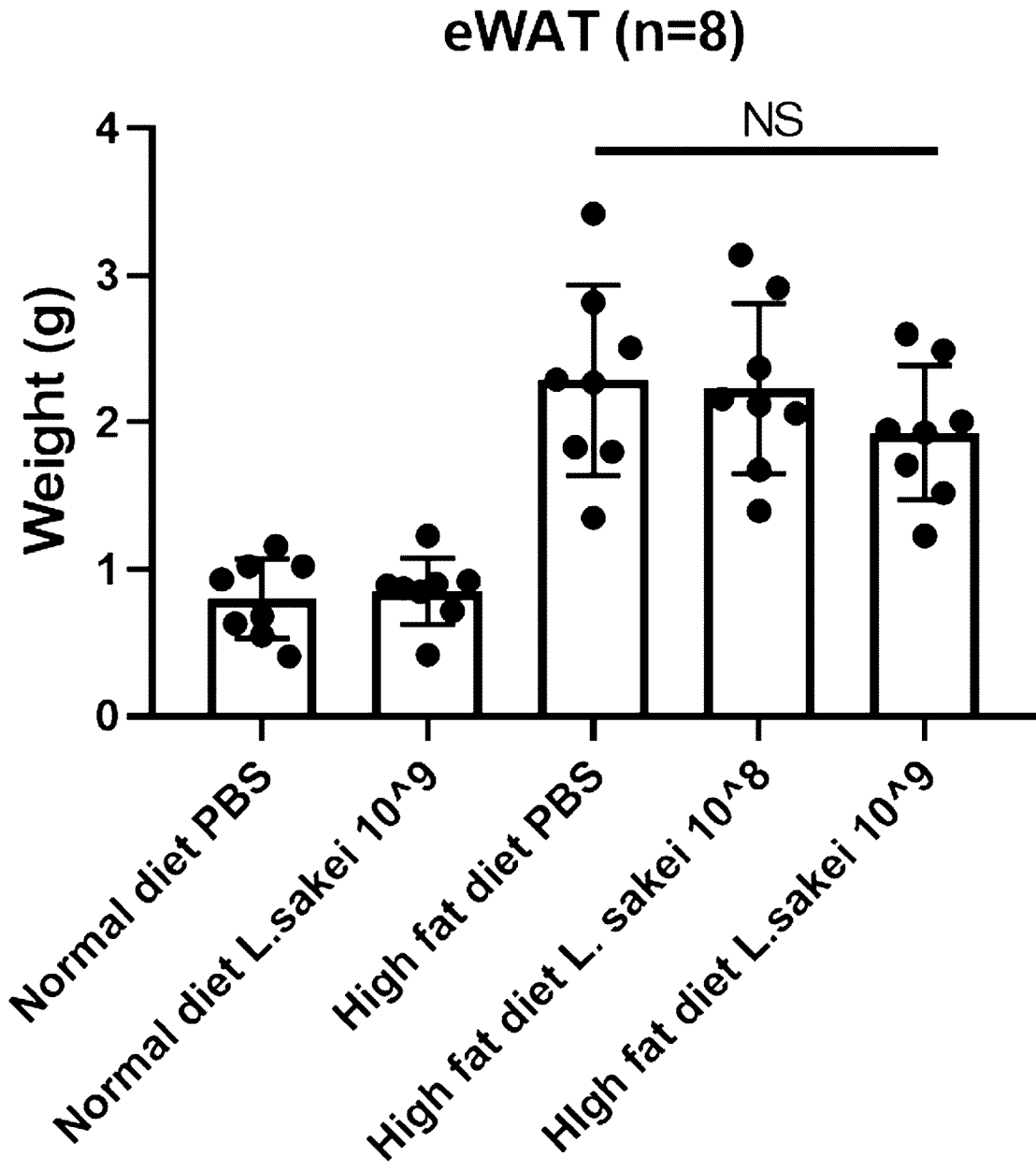


[도6]

***L. sakei* Weight Average (n=8) Live bacteria group**

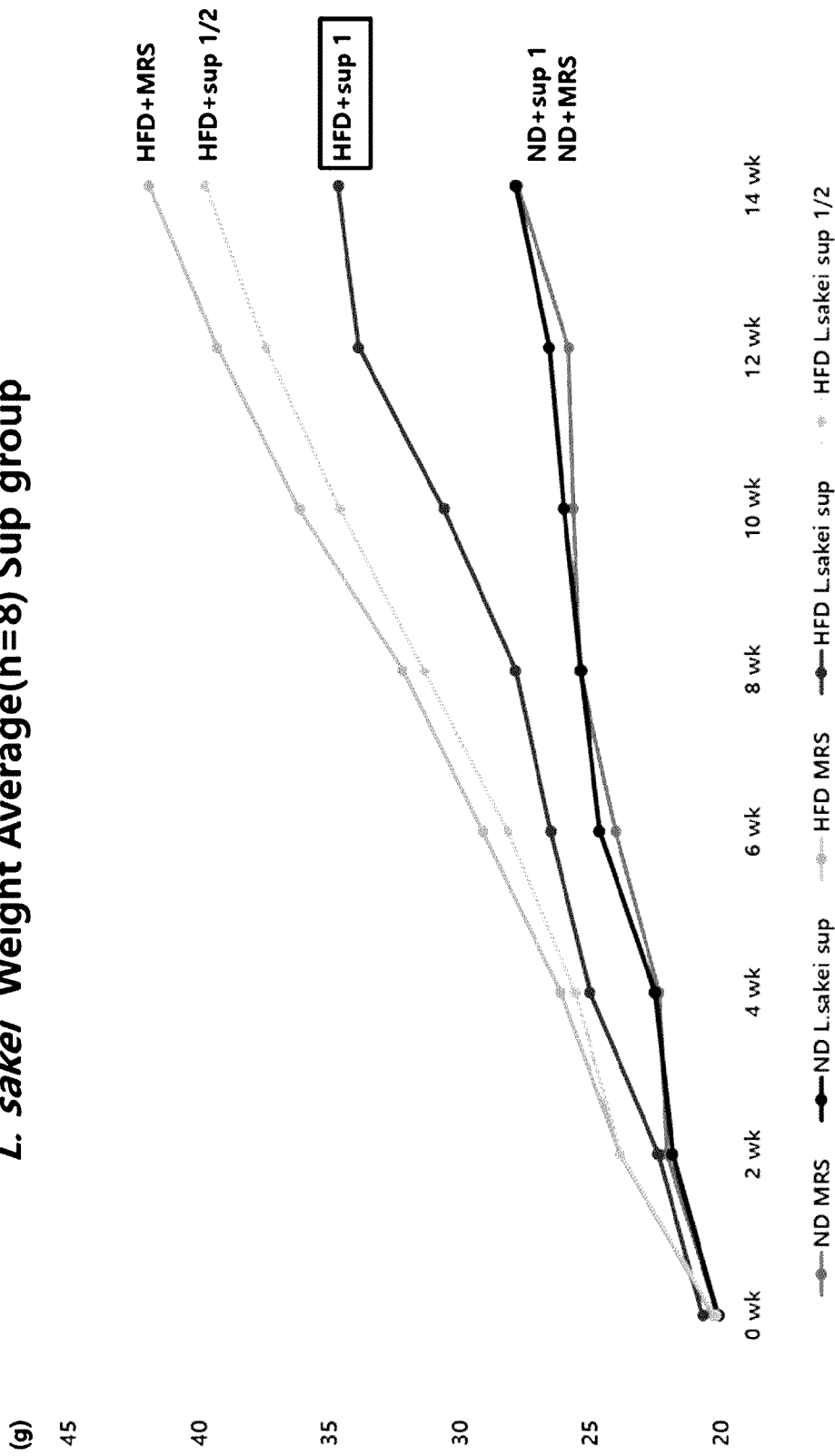


[도7]

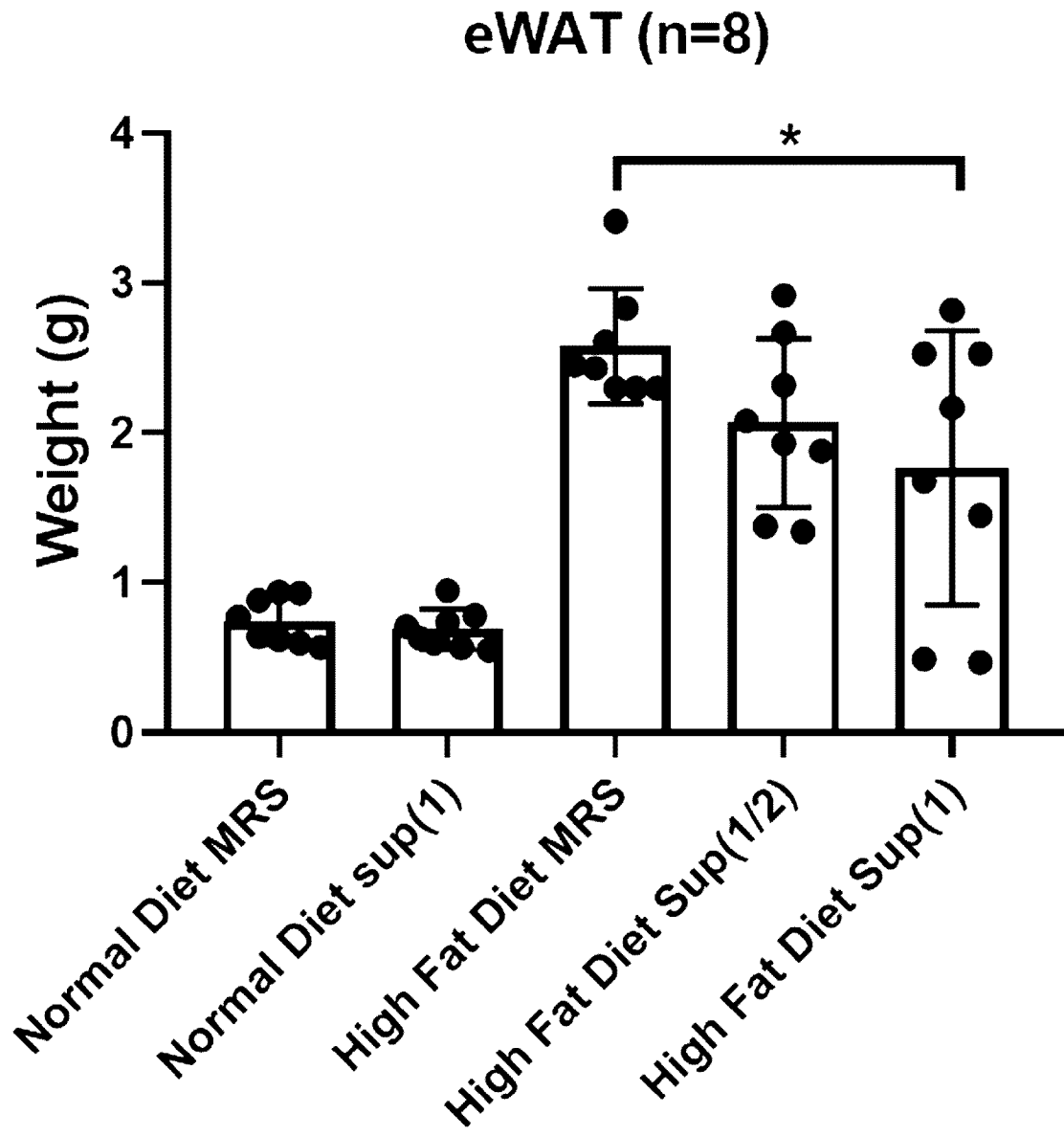


[도8]

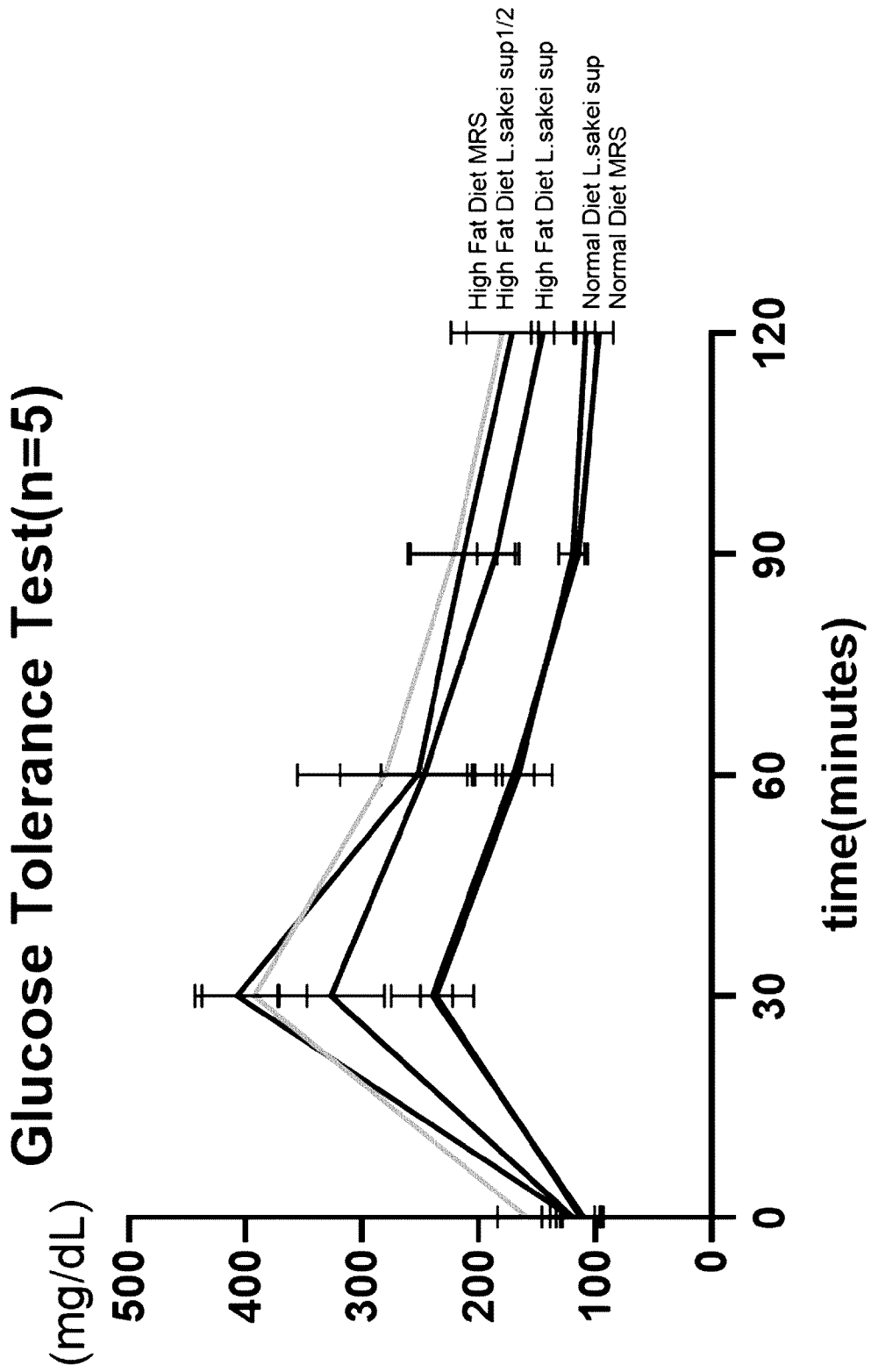
L. sakei Weight Average (n=8) Sup group



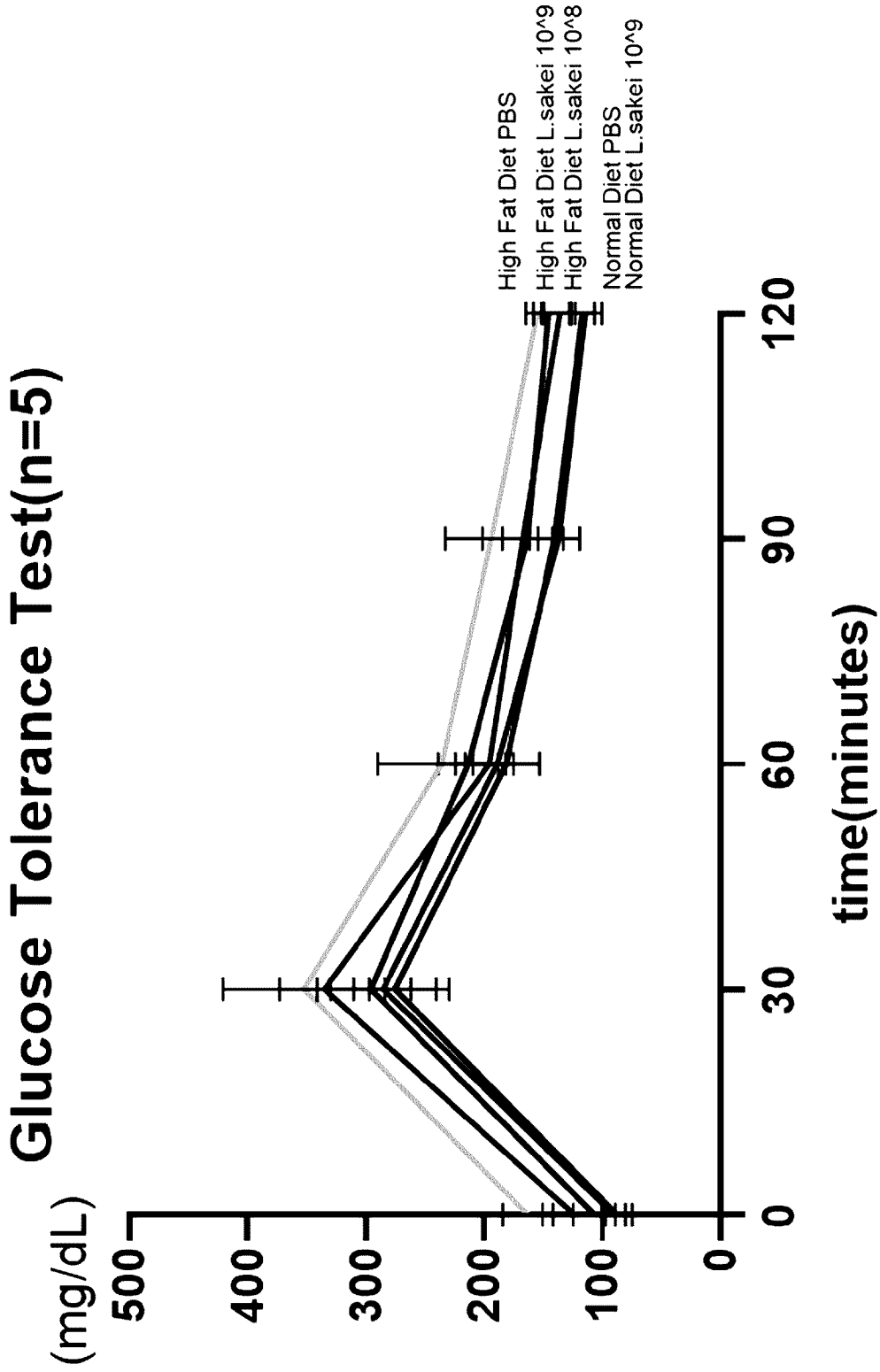
[도9]



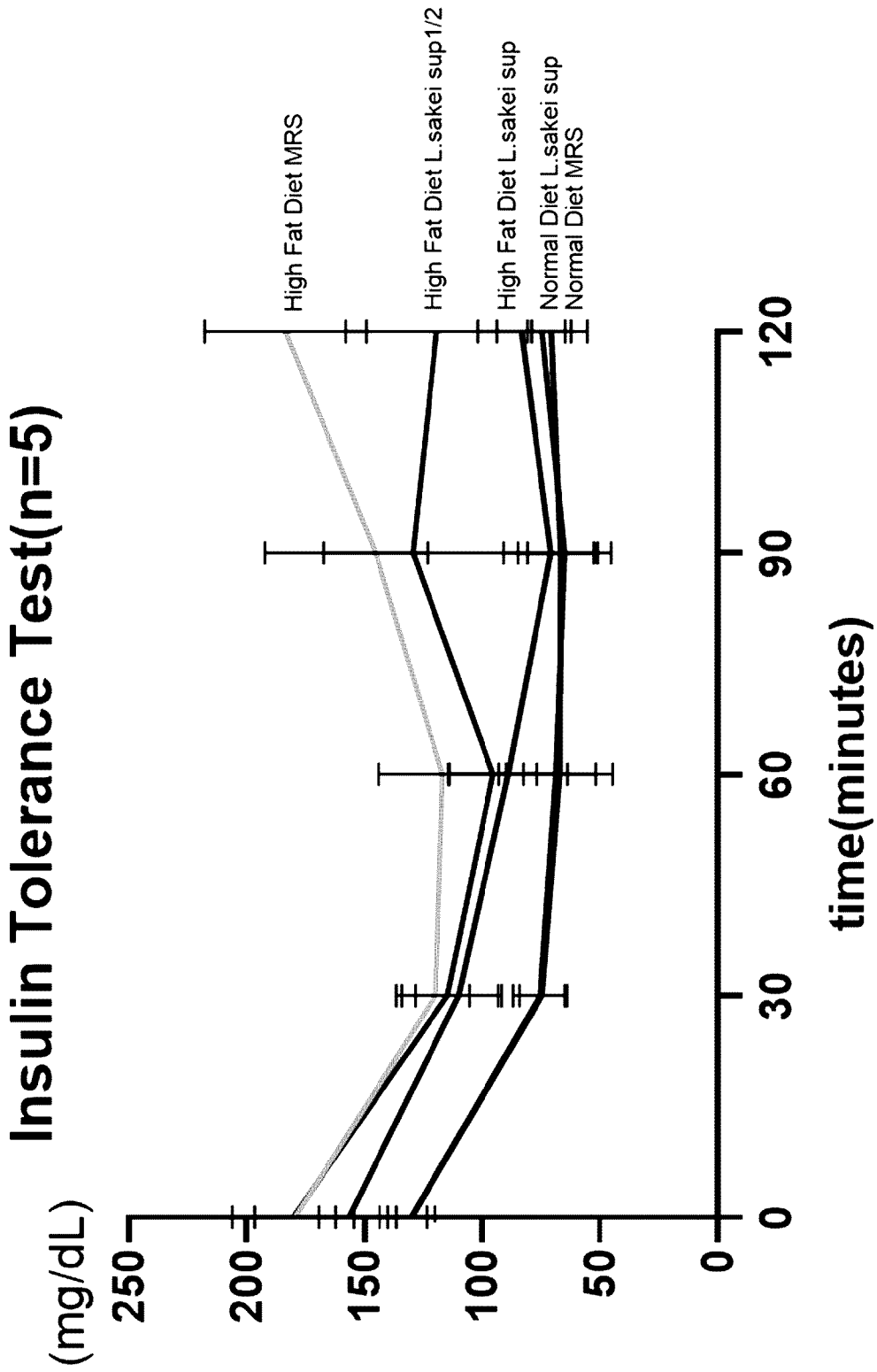
[도10]



[도11]



[도12]



[도13]

